UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Desenvolvimento de métodos para fracionamento de proteínas e metaloproteínas em carne bovina

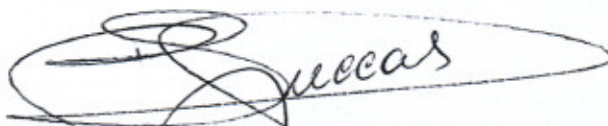
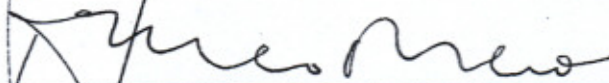
*Rodolfo Carapelli**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS (área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA).

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira
*Bolsista CNPq

São Carlos – SP
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Rodolfo Carapelli,** *realizada em 30 de setembro de 2011:*

Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

Profa. Dra. Clésia Cristina Nascentes

Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

“...Já vivi tanta coisa,
tenho tantas a viver
“Tô” no meio da estrada
e nenhuma derrota
vai me vencer...”
(Humberto Gessinger)

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha família.

À Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira, pela orientação, conhecimento, paciência, apoio e amizade. E à Embrapa, em nome da Dra. Ana Rita, pela oportunidade de usufruir suas dependências e infra-estrutura.

Ao Dr. Gilberto Batista de Souza por todo apoio no decorrer do trabalho.

Aos Profs. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pelas contribuições no decorrer do trabalho.

À Dra. Renata Tieko Nassu, Dr. Rymer Ramiz Tullio e à equipe do Laboratório de Análises de Carne da Embrapa Pecuária Sudeste.

À Dra Márcia Cristina de Sena Oliveira e ao Me. Rodrigo Giglioti pela disponibilidade e ajuda nas análises eletroforéticas.

Aos Professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Aos amigos do GAIA, o meu mais sincero agradecimento por tudo.

Aos amigos do ex-GAIA com os quais tive o prazer de conviver.

Aos funcionários da Embrapa Pecuária Sudeste, pelo auxílio técnico e amizade, especialmente à Cidinha, Cristina, Cadu, Gilbertinho, Lourdes, Marcão, Natal, Vitão, Flavinha, Avelardo e todos os estagiários que passaram pelos laboratórios da unidade, pela amizade e contribuições significativas ao desenvolvimento do trabalho.

Aos grandes amigos: Caio, Carlinha, Catarinie, Clarice, Eveline, Fernanda, Lucio, Marcelo, Patrícia Helena, Rodrigo, Silmara e Wladiana pela amizade e excelente convivência dentro e fora de laboratório.

Aos meus grandes amigos de graduação que sempre contribuíram muito no caminho que trilhei até aqui, em especial: Adriano Borges, Alexandra, Ana Claudia, Andréia, Camila, Débora, Fernanda, Franciele, Hércules, Juliana, Leandro, Lenilson, Lílian, Oscar, Roberta, Silvia, Thiago, e todos os amigos que foram agregados a esta saudosa turma.

Aos meus amigos maringaense que me acolhem nos meus regressos.

A todos os amigos com os quais dividi república.

Aos amigos feitos no departamento de química da UFSCar e na Embrapa Pecuária Sudeste durante o período de realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade e especialmente às secretárias da pós, Ariane, Cristina, Luciani por serem tão prestativas.

A todos os quais eu cometi a injustiça de não listar acima.

Muito Obrigado!

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS PARA FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS E METALOPROTEÍNAS EM CARNE BOVINA. Esta tese teve como principal objetivo o fracionamento de metaloproteínas em amostras de carne bovina. Para isso, inicialmente foi proposto um método para extração de proteínas nas amostras de interesse utilizando extrator em meio alcalino tamponado e o emprego de surfactantes. Após otimização foram observados aproximadamente 85 % de eficiência de extração e d.p.r. < 5%, demonstrando ser eficiente e reprodutível, além de ser um método simples e rápido. A seguir foram avaliadas as condições experimentais de análise para o fracionamento das metaloproteínas. Foram empregadas cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) como técnicas físico-químicas de separação e espectrometria de massa e de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-MS e ICP OES, respectivamente) como métodos de detecção. Os analitos monitorados foram Ca, Cu, Fe, Mg e Zn, contudo, o Mg não foi detectado em nenhuma das condição estudadas. Para a obtenção de uma condição de compromisso de detecção para os outros 4 elementos, optou-se por utilizar condições de plasma menos energéticas em ICP-MS (“cool” plasma), como forma de se evitar interferências isobáricas provindas do plasma quando da determinação dos elementos Ca e Fe. Por fim, amostras de carne com diferentes períodos de maturação foram avaliadas por PAGE e HPLC-ICP-MS. Aproximadamente 17 bandas protéicas puderam ser observadas por PAGE, sendo a banda de 43 kDa a mais intensa. Alguns picos foram detectados para cada elemento por cromatografia líquida por exclusão de tamanho. Todos os elementos apresentaram pelo menos uma fração acima do volume morto da coluna. O Fe e o Zn, além dessa fração, apresentaram também uma fração de 17 e 27 kDa, respectivamente.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF METHODS FOR FRACTIONATION OF PROTEINS AND METALLOPROTEINS IN BEEF. This thesis aimed the fractionation of metalloproteins in beef samples. To this purpose initially it was proposed a method for extraction of proteins using the sample extractor in buffered alkaline medium and surfactant solutions. After optimization were observed approximately 85% extraction efficiency and r.s.d. < 5%, showing the efficiency, reproducibility, simplicity and velocity of the method. After that, the experimental conditions for the fractionation of metalloproteins were evaluated. High performance liquid chromatography (HPLC) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were used for physical-chemical separation and mass spectrometry and optical emission inductively coupled argon plasma (ICP OES and ICP-MS, respectively) as detection methods. The analytes Ca, Cu, Fe, Mg and Zn were evaluated; however, Mg was not detected in any condition of the study. To obtain a condition of appointment of detection for the other four elements, it was chosen to use less energy plasma conditions in ICP-MS (cool plasma), in order to avoid isobaric interference emanating from the plasma when the determination of the elements Ca and Fe. Finally, samples of meat with different maturation stages were analyzed by PAGE and HPLC-ICP-MS. Approximately 17 protein bands could be observed by PAGE and the band of 43 kDa was the more intense. Some peaks were detected for each element by HPLC size exclusion. All items showed at least a fraction above the dead volume of the column, Fe and Zn, and this fraction, also showed a fraction of 17 and 27 kDa respectively.

Sumário

Introdução

1 Introdução

As proteínas desenvolvem funções determinantes no organismo humano. Dentre elas destacam-se: estrutural, catalisadora dentre muitas outras. O papel central ocupado por elas é evidenciado no fato de que a informação genética é, em última instância, expressa como proteínas (Lehninger, 1984).

A carne bovina é uma das principais fontes de proteína animal na nutrição humana. A proteína encontrada na carne é nutricionalmente completa, sendo de ótima qualidade, principalmente por conter aminoácidos essenciais. Estima-se que 100 g de carne magra - coxão-mole, por exemplo, depois da cocção contém entre 20 e 30 g de proteína, o que corresponde a aproximadamente 50% das necessidades diárias do ser humano adulto (SIC, acesso 01/07/11).

As proteínas também desempenham um papel importante nas propriedades organolépticas (características percebidas pelos sentidos) da carne. É bem sabido que o perfil proteico está intimamente relacionado com a maciez e a coloração da carne bovina.

Muitas proteínas, como as enzimas ribonuclease e a quimotripsina, contêm apenas aminoácidos e nenhum outro componente químico; são consideradas proteínas simples ou apoproteínas. Entretanto, algumas proteínas contêm componentes químicos em adição aos aminoácidos, chamadas proteínas conjugadas ou holoproteínas. A parte não-aminoácido de uma proteína conjugada é geralmente chamada de grupo prostético. As proteínas conjugadas são classificadas com base na natureza de seu grupo prostético; por exemplo: lipoproteínas contêm lipídeos, glicoproteínas contêm moléculas de açúcares, metaloproteínas contém um metal ou semi-metal específico. Geralmente um grupo prostético desempenha um papel importante na função biológica da proteína (Lehninger, 1984). Nessa tese serão estudadas as metaloproteínas.

A forma química como determinado elemento ocorre em matrizes complexas determina o seu comportamento biológico (biodisponibilidade, toxicidade, essencialidade). Por exemplo, a absorção do ferro por humanos é mais efetiva quando ele esta ligado no anel porfirínico de proteínas como hemoglobina e mioglobina. O estado de oxidação do crômio determina sua toxicidade, o crômio no estado de oxidação (III) é um micronutriente para humanos enquanto o Crômio no estado de oxidação (VI) e uma espécie carcinogênica. Esses exemplos ilustram a importância de se realizar estudos onde espécies individuais de cada elemento são

determinadas em conjunto com os teores totais. Este tipo de análise é conhecido como análise de especiação (Martino *et. al.*, 2002).

Na carne bovina esses estudos se tornam importantes, visto que ela contém uma concentração elevada de elementos como Fe, Zn, Mg, Ca, Cu. Além disso, alguns desses elementos se encontram em uma forma bastante biodisponível na carne (por exemplo, o Fe ligado à proteínas porfirínicas) e outros participam em processos bioquímicos que determinam algumas propriedades organolépticas (por exemplo o Ca que participa das quebras proteolíticas como cofator da enzima calpaína). Em vista disso, a especiação desses elementos pode levar a melhoras tanto nutricionais quanto da qualidade organoléptica do produto final.

Para realização de análises de especiação, fundamentalmente são necessários processos de separação e detecção, sendo que são de extrema importância a escolha de técnicas de separação eficientes e um sistema de detecção bastante sensível. Cromatografia líquida e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado tanto quanto eletroforese em gel e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite têm sido empregadas com grande êxito para esse fim (Gómez-Ariza, 2004).

O preparo da amostra é outro parâmetro muito crítico neste tipo de análise, visto que é necessária a extração dos analitos de interesse sem que as interações deles com outros constituintes da amostra sejam afetados. Por isso, essa variável deve ser cuidadosamente avaliada e processos brandos devem ser preferidos.

Considerando a importância econômica crescente para o Brasil do mercado da carne bovina, sua importância nutricional, a influência que o perfil proteico tem na qualidade da carne de bovinos, além da escassez de trabalhos relacionados à minerais ligados à esta fração nessa matriz, esse trabalho se propõe a estudar uma condição de compromisso para determinação das metaloproteínas de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn e fazer um estudo de uma possível relação desses compostos com propriedades organolépticas da carne, mais especificamente a maciez.

Objetivos

2 Objetivos

Os objetivos dessa tese são:

- Propor um método de extração simples, brando e eficiente de proteína para amostra de carne de bovinos;
- Avaliar as condições para detecção simultânea dos elementos Ca, Cu, Fe, Mg e Zn por espectrometria de massas ou espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente;
- Avaliar o perfil das metaloproteinas em amostras de carne com diferentes períodos de maturação e buscar alguma diferença no perfil de metaloproteína decorrente das quebras proteolíticas de diferentes períodos de maturação.

Revisão da Literatura

3 Revisão da Literatura

3.1 *Carne bovina*

Uma alimentação saudável é muito importante para o funcionamento e bem estar do organismo. Doenças crônicas incluindo câncer, doenças cardiovasculares, diabete tipo 2, obesidade e síndromes metabólicas estão intimamente relacionadas com uma nutrição pobre e dieta inapropriada. Dietas balanceadas contendo frutas, vegetais, leite, fibras dietéticas, carne bovina, peixe e aves podem reduzir os riscos dessas doenças (Bovell-Benjamin et. al., 2009).

A carne bovina é um importante componente para uma dieta saudável. Ela é praticamente desprovida de carboidratos e de fibras dietéticas. Entretanto é um alimento nutricionalmente denso devido à alta quantidade de proteínas associada a um baixo valor calórico. Também constitui uma excelente fonte de lipídios essenciais, de vitaminas do complexo B (principalmente B12) e de minerais como ferro e zinco numa forma altamente assimilável pelo organismo (SIC, acesso 01/07/11).

Apesar do elevado valor nutricional, analisando-se os dados do consumo *per capita* mundial de carne bovina durante os últimos anos, percebe-se que no período de 1995 a 2004 houve uma redução geral no consumo. Essa redução deveu-se à inúmeros fatores, sendo alguns exemplos o preço elevado do produto, preocupações quanto à segurança do alimento e mudanças nos próprios hábitos alimentares, tais como o crescente posicionamento de organizações não governamentais (ONGs) contra a produção intensiva de carne, preocupadas com o bem-estar animal (Barcellos, 2007).

Contudo, no período de 2005 a 2006 o consumo de carne bovina voltou a aumentar mundialmente em função principalmente do aumento da renda da população. Além disso, países emergentes do oriente como China e Coréia do Sul também elevaram o consumo doméstico desse produto em função das mudanças de hábitos alimentares e na renda dos consumidores (Barcellos, 2007).

O Brasil é um importante mercado exportador e consumidor de carne bovina. De acordo com a USDA (United States Department of Agriculture) os brasileiros são grandes consumidores desse alimento chegando a consumir até o dobro da quantidade de carne por habitantes/ano quando comparados com países europeus, por exemplo. Quanto à exportação, de janeiro a dezembro de 2006 a quantidade de

carne exportada foi de 2,5 milhões de tonelada, totalizando US$ 4 bilhões. Segundo dados do ICONE (Instituto de Estudos do Comércio e Negociações Internacionais) (2006) o rebanho brasileiro vem crescendo 2,7% ao ano e a tendência segue em alta (Barcellos, 2007).

Em vista dessa grande importância nutricional e comercial que a carne bovina desempenha mundialmente, torna-se importante que além da busca pelo crescimento produtivo seja realizada uma criteriosa avaliação de qualidade no produto final.

3.2 *Qualidade da carne bovina*

Diversos parâmetros são avaliados para determinar a qualidade da carne bovina, sendo que suculência, sabor e maciez são as variáveis primárias quando se trata dos padrões procurados pelo consumidor (Breidenstein & Carpenter, 1983). Dentre essas variáveis, a maciez exerce um papel fundamental, por ser o atributo mais procurado pelo consumidor, além de ser influenciado por uma complexa gama de fatores como a idade dos animais abatidos, o manejo pré e pós-abate, o estado nutricional e a raça dos animais.

Para se entender melhor os processos que determinam a maciez na carne, é necessário que se faça uma distinção entre os termos músculo e carne. A carne, embora reflita grandemente a natureza química e estrutural do músculo, difere-se dele por uma série de alterações bioquímicas ocorridas no músculo por ocasião da morte do animal (Lawrie, 2005).

A conversão do músculo em carne pode ser dividida em quatro etapas principais: manejo pré-abate, sangria e evisceração, processos bioquímicos resultantes da parada de circulação sanguínea e por fim condicionamento ou maturação da carne. Contudo, nesta revisão apenas os dois últimos serão descritos devidos à sua importância para o trabalho desenvolvido.

3.3 *Processos bioquímicos que ocorrem no tecido muscular após a parada de circulação sanguínea*

Com a morte do animal e a parada de circulação sanguínea, ocorrem mudanças no tecido muscular, entretanto, os tipos específicos de metabolismo de seus diferentes músculos continuam a ocorrer sob controle local.

Para se entender esta etapa, é necessária uma pequena revisão sobre o sistema muscular. Os músculos do sistema contrátil são formados basicamente por células musculares denominadas miofibrilas (Leningher, 1984). As miofibrilas são compostas essencialmente de miofilamentos sendo 2 deles de maior importância, filamento espesso e filamento fino. Os miofilamentos são divididos em bandas, banda I com propriedades isotrópicas e banda A com propriedades anisotrópicas conforme esta ilustrado na figura 3-1. Como pode ser observado, a banda A, mais escura é segmentada por uma região mais clara denominada banda H e a banda I mais clara é segmentada por uma região mais escura, denominada banda Z (Toldra, 2010). Cabe ainda ressaltar a presença nas miofibrilas de uma organela, denominada sarcomero, onde estão contidos todos os elementos necessários para o ato da contração em nível molecular.

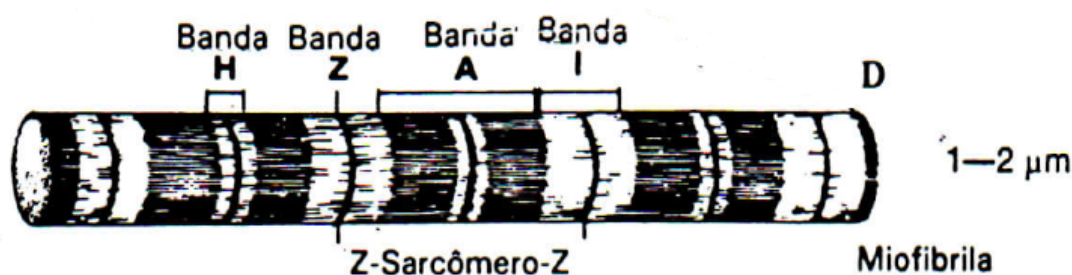



Figura 3-1. Representação estrutural da miofibrila (Fonte: Conn & Stumpf, 1980)

Quanto a composição, o filamento fino compõe a banda I e é formado majoritariamente pela proteína actina, a banda A é composta pelo filamento espesso e é formada majoritariamente pela proteína miosina. A miosina é uma proteína carregada negativamente com ponto isoelétrico de 5,3 e massa molar de cerca de 500 kDa. Consiste de uma calda em alfa-hélice e uma cabeça globular que interage com a actina no filamento fino. Cada molécula de miosina consiste de duas cadeias pesadas de aproximadamente 220 kDa e dois grupos de cadeias leves de 14 e 20 kDa. A actina é uma proteína globular (actina-G) que polimeriza para formar filamentos (actina-F). A actina-G tem aproximadamente 42 kDa. Há aproximadamente 400 moléculas de actina por filamento fino (Toldra, 2010).

A contração muscular se dá em cada sarcômero pelo deslizamento do filamento espesso nos espaços entre os filamentos delgados, provocando o encurtamento de toda a fibra muscular. Todo esse processo é realizado através da

hidrólise do ATP por uma enzima ligada à cabeça globular da miosina que esta regularmente espaçada ao longo do filamento espesso. Os processos de contração e relaxamento muscular são controlados pela concentração de Ca^{2+} no citosol. Quando o nervo motor estimula a fibra muscular, túbulos membranosos liberam Ca^{2+} que se liga a uma proteína reguladora chamada troponina. Enquanto o íon Ca^{2+} estiver presente no citosol muscular, a troponina permanece ativa. O relaxamento muscular ocorre quando os impulsos nervosos cessam e o Ca^{2+} for transportado do sarcoplasma por ação da bomba de cálcio (Leningher, 1984).

Após a morte do animal, embora o músculo não esteja se contraindo de modo ativo, a energia esta sendo consumida para manter a temperatura e a integridade das células. Com a interrupção do fornecimento de O_2 para os músculos, as enzimas do citocromo não podem operar a resintese do ATP e com isso ocorre a queda da energia armazenada e a formação de actomiosina, provocando a inextensibilidade do músculo (*rigor-mortis*). (Lawrie, 2005).

3.4 *Maturação*

A etapa de maturação é o processo final de transformação do músculo, sendo esse um prolongamento dos processos bioquímicos que já vem ocorrendo após a parada de circulação do sangue. Pode ser mantido por até 14 dias em baixas temperaturas e sob vácuo, visando uma carne com maior maciez.

Na ausência de crescimento microbiano, a manutenção da carne não-processada acima do ponto de congelamento da água é conhecida como “condicionamento” ou “maturação” e tem sido associada ao aumento da maciez e depuração do sabor. Durante as primeiras 24 a 36 horas *post mortem*, a circunstância dominante é a glicólise, onde o músculo passa a utilizar a via anaeróbica, para obter energia para um processo contrátil desorganizado, nesse processo há transformação de glicogênio em glicose, e como a glicólise é anaeróbica, gera lactato que propicia a queda do pH.(Lawrie, 2005 e Embrapa Gado de Corte, acesso 16/02/12). Esta queda do pH tem um papel determinante nesta etapa de maturação.

As principais enzimas presentes no processo de maturação são as calpaínas e catepsinas capazes de hidrolisar as proteínas miofibrilares (Andriguetto *et. al.*, 2006).

As catepsinas são proteases ácidas usualmente localizadas nos lisossomos, células fagocitóticas e retículo sarcoplasmático. No músculo de bovinos, com o decréscimo do pH e temperatura durante o *armazenamento post-mortem* ocorre o rompimento da membrana lisossomática e a liberação das catepsinas, sendo que as catepsinas B, D, L e H degradam algumas proteínas durante o processo de maturação. Todavia a sua contribuição é muito pequena para o processo de maturação (Toldra, 2010).

As calpaínas são cisteínas proteases dependentes de Ca^{2+}. Atualmente, pelo menos 15 calpaínas diferentes são conhecidas em mamíferos, mas μ e a m-calpaína são as mais relevantes na maturação. Calpaína I ou μ-calpaína requerem concentrações de Ca^{2+} na faixa de μmol L^{-1} (10-50 μmol L^{-1}). Calpaína II ou m-calpaína são ativadas pelas concentrações de 0,3-1,0 mmol L^{-1} de Ca^{2+}. Ambas calpaínas estão localizadas no sarcoplasma e concentradas ao redor da linha Z, ligadas ao seu inibidor, calpastatina. (Toldra, 2010, Conn & Stumpf, 1980)

Ambas μ-calpaína e m-calpaína apresentam menor taxa de atividade diante de substratos de proteínas miofibrilares em pH e força iônica similares aos encontrados nos músculos post-mortem. Alterações de pH e força iônica podem causar algumas mudanças conformacionais que tornam o substrato mais susceptível à clivagem pelas calpaínas. Diante disso, alguns estudos mostram que as μ-calpaínas são ativadas quando o pH decai de 6,8 para aproximadamente 5,7; enquanto que as m-calpaínas são ativadas em pH em torno de 5,7 (Lonergan *et. al.*, 2010, Andriguetto *et. al.*, 2006).

Por causa de sua limitada especificidade, a μ- e a m-calpaína não degradam as proteínas para os seus constituintes aminoácidos, nem degradam as principais proteínas miofibrilares, como a miosina e a actina. Um papel hipotético para as calpaínas no músculo é a proteólise específica das proteínas do citoesqueleto (titina e nebulina) e os filamentos intermediários (desminina) para iniciar a degradação da proteína miofibrilar. Após o desprendimento dos miofilamentos da miofibrila, essa fica suceptível à ação de proteossoma e lisossoma para a completa degradação até aminoácidos (Lonergan *et. al.*, 2010, Andriguetto *et. al.*, 2006).

Por fim, a calpastatina completa o complexo sistema das calpaínas. Essa enzima inibe a ação das capaínas, diminuindo a degradação das proteínas miofibrilares e reduzindo a maciez da carne. A calpastatina é degradada no músculo post-mortem, sendo que a taxa de degradação e inativação desta enzima esta

intimamente relacionada à proteólise e à maciez observada na carne (Lonergan *et. al.*, 2010, Andriguetto *et. al.*, 2006).

3.5 *Mudanças proteolíticas ocorridas durante a maturação da carne bovina*

As principais mudanças durante a maturação da carne que proporcionam uma maior maciez provêm de mudanças proteolíticas ocorridas na estrutura miofibrilar e proteínas correlatas. Algumas proteínas são peças chave neste processo.

A actina e a miosina são as duas proteínas mais abundantes na miofibrila, apesar de não sofrerem grandes alterações nas suas estruturas, mesmo pequenas mudanças na extensão ou força da ligação cruzada entre elas podem afetar o acesso das enzimas proteolíticas ao substrato (Lonergan *et. al.*, 2010).

A titina, maior proteína encontrada em mamífero com aproximadamente 3000 kDa, é a terceira proteína mais abundante na miofibrila e integra a linha Z no filamento espesso. Sua função é manter o alinhamento sarcomérico durante a contração muscular. No músculo post-mortem, a degradação da titina pode causar o enfraquecimento da estrutura miofibrilar e conseqüentemente a diminuição da integridade muscular. Os produtos de degradação da titina são principalmente duas outras proteínas de aproximadamente 2400 e 1200 kDa (Lonergan *et. al.*, 2010).

A nebulina é outra mega proteína (600-900 kDa) que se estende a partir da linha Z até a extremidade dos filamentos finos. Ela é altamente inextensível, sendo denominada régua molecular. Apesar de a nebulina parecer relacionada com a maciez da carne, o motivo ainda não é comprovado (Lonergan *et. al.*, 2010).

A troponina T é um substrato para a μ-calpaína. A sua degradação em polipeptídeos de 28 e 30 kDa esta fortemente relacionada com a força de cisalhamento (método objetivo para determinação da maciez da carne onde, por meio de um texturômetro é medida a força necessária para o cisalhamento de uma seção transversal de carne, sendo que quanto maior a força dispensada, menor a maciez apresentada pela carne) . Uma possível explicação para isso seria que a sua fragmentação levaria à quebra do filamento fino na banda I, possivelmente levando a fragmentação da miofibrila e de um modo geral à perda de integridade muscular. Outra explicação seria mudanças nas interações entre os filamentos fino e espesso devido à sua degradação. Contudo sua participação no processo de maturação não é completamente entendida (Lonergan *et. al.*, 2010).

A dismina circunda a linha Z da miofibrila e intermedia suas conexões com outras estruturas, incluindo sarcolema (membrana celular). É possível que a degradação do elemento estrutural que conecta os principais componentes (miofibrila) do músculo e ainda a camada periférica das miofibrilas à membrana celular poderia afetar o desenvolvimento da maciez. O maior produto de degradação da dismina que é frequentemente visto na carne é um polipeptídeo de aproximadamente 38 kDa (Lonergan *et. al.*, 2010).

A filamina possui uma massa molar de aproximadamente 245 kDa e sua concentração é muito pequena (aproximadamente 1% do total da proteína muscular). Como a filamina pode estar associada com filamentos intermediários na linha Z, sua degradação poderia quebrar ligações importantes para miofibrila. Um estudo mostrou que a filamina é degradada para formar um produto de aproximadamente 240 kDa (Lonergan *et. al.*, 2010, Lonergan *et. al.*, 1996).

Como pode ser visto, proteínas e minerais, o Ca em particular, têm um papel fundamental no processo de transformação do músculo em carne, além de estarem intimamente relacionados com a maciez do produto final. Entretanto, o número de trabalhos nesta área não é muito extenso. Ao realizar-se uma pesquisa na base de dados “Web of Science” com as palavras “proteins, meat and profile” obteve-se 803 respostas. Utilizando-se “protein, beef and profile”, obteve-se 397. Para combinação de palavras “protein, meat and speciation” e “protein, beef and speciation”, 23 e 12 resultados foram apresentados, respectivamente. Levando-se em conta as mesmas palavras mas substituíndo o verbete protein por metalloprotein nenhum resultado é encontrado (Web of Knowledge, www.isiknowledge.com).

3.6 *Metaloproteínas*

Analisando a tabela periódica, podem ser listados cerca de 25 elementos que são requeridos pela maioria dos sistemas biológicos (Crichton, 2008). Alguns deles são encontrados em concentração razoavelmente elevadas em carne de bovinos. Matos *et. al.* (2009), relataram concentrações de alguns minerais em cortes comerciais de carne de bovinos: Ca (139 - 211 mg kg^{-1}), Cu (1,4 - 3,1 mg kg^{-1}), Fe (67,8 - 94,4 mg kg^{-1}), Mg (792 - 1025 mg kg^{-1}), Mn (2,0 - 2,9 mg kg^{-1}) e Zn (121 - 180 mg kg^{-1}).

Mais de 30% de todas as proteínas exploram um ou mais minerais para desempenhar sua função específica e 40% de todas as enzimas contém cátions

metálicos. Dos 20 aminoácidos presentes em proteínas, apenas um pequeno grupo tem potencialidade de ligar-se a esses cátions metálicos. A cisteína é frequentemente encontrada como ligante de Fe e Cu. Histidinas podem se ligar a metais em duas posições, e tem grande preferência por Cu^{2+}. Oxigênios carboxilados do aspartato ou do glutamato ligam preferencialmente metais alcalinos e alcalino-terrosos como o Ca^{2+}. O Fe^{3+} também tem uma grande afinidade por esses grupos, além de fenolato da tirosina ou grupos sulforados como os da metionina (Crichton, 2008, Gomes & Wittung-Stafshede, 2011).

Contudo, ainda que as características das proteínas resultem em uma certa seletividade por metais específicos, a afinidade por cátions metálicos parece seguir uma ordem de preferência compatível com a série de Irving-Williams para íons bivalentes (Mn < Fe < Co < Ni < Cu > Zn). (Gomes & Wittung-Stafshede, 2011, Irving & Williams, 1953). Segundo Garcia et. al. (2006), as proteínas geralmente interagem fracamente com os íons monovalentes K^{+} e Na^{+}, moderadamente com alcalino-terrosos como Ca^{2+} e Mg^{2+} e por fim, devido às caracteríscas apresentadas (densidade, pequeno raio atômico entre outras) os metais de transição como Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+} e Mo^{2+} estão fortemente coordenados no sítio proteíco, sendo por isso encontrados em maior quantidade ligados às essas estruturas. Essas informações podem ser sumarizadas na tabela 3-1, onde a correlação entre a força de ligação, mobilidade e função de alguns metais com moléculas orgânicas são apresentadas (Crichton, 2008).

Tabela 3-1 Força de ligação, mobilidade e função de íons metálicos em moléculas orgânicas

Íon metálico	Ligação	Mobilidade	Função
Na^{+}, K^{+}	Fraca	Alta	Contra-íons
Mg^{2+}, Ca^{2+}	Moderada	Semi-móvel	Estrutural
Zn^{2+}	Moderada/forte	Intermediária	Ácido de Lewis, estrutural
Fe, Cu, Mn e Mo*	Forte	Baixa	Transporte de oxigênio e reações redox

* carga não mencionada, já que varia com o estado de oxidação (fonte: Crichton, 2008).

Esforços e avanços têm sido feitos para entender as metaloproteínas, principalmente levando em consideração sua estrutura e a função do sítio metálico além da implicação biologica dessa interação (Garcia et al., 2006). Por exemplo, já é

bem sabido que a absorção do ferro heme, constituinte da hemoglobina e da mioglobina ocorrem mais eficientemente na dieta em função de que este fica protegido dentro do anel porfirínico e não reage com fatores inibidores à sua absorção (Azevedo & Chasin, 2003).

O zinco é outro elemento, segundo Wedekind *et. al.* (1992), que tem maior biodisponibilidade quando ligado a compostos orgânicos. Segundo este trabalho, há uma maior biodisponibilidade da zinco-metionina em relação ao sulfato de zinco e óxido de zinco devido à como a forma orgânica se comporta na presença de possíveis agentes inibidores como fitato e fibras. Segundo Fairweather-Tait & Hurrel (1996), a biodisponibilidade de Zn pode variar de 5 a 50% dependendo da dieta, sendo que mesmo em refeições ricas em fitato, a presença de proteína animal aumenta sua absorção.

O cobre e o magnésio também têm sua absorção aumentada em uma dieta rica em proteínas (Fairweather-Tait & Hurrell, 1996). Estudos mostram que no caso do Cu, proteínas de origem animal têm um efeito ainda mais significante na sua biodisponibilidade do que a proteína de origem vegetal (Lonnerdal, 1996).

A concentração de elementos traço em alimentos, amostras ambientais ou biológicas na legislação internacional é regulada em função dos teores totais dos elementos (Berg & Larsen, 1999, Fairweather-Tait, 1999), no entanto, a forma como o elemento se encontra na matriz de interesse, na carne bovina por exemplo, pode acrescentar algumas informações interessantes tanto a respeito de características organolépticas, visto que a interação do cálcio com proteínas parece estar intimamente relacionada com a maciez da carne bovina, quanto sobre a biodisponibilidade de alguns elementos.

3.7 *Especiação química*

A atividade analítica de identificar e/ou quantificar uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra é denominada análise de especiação. Pode ser importante em diversos campos de pesquisa, tais como ambiental, geoquímico, bioquímico, toxicológico e nutricional. O nível estrutural de cada elemento químico é de extrema importância e a determinação da composição nuclear (isotópica), eletrônica ou estado de oxidação, de complexos e compostos inorgânicos, compostos organometálicos, orgânicos e complexos macromoleculares devem ser levadas em consideração (Templeton, 2000).

A abundância isotópica de um elemento pode variar por muitas razões, incluindo decaimento radioativo e separação física. Isótopos podem ter comportamento biológico diferente, os sais de ^{7}Li por exemplo são usados como droga contra doenças depressivas enquanto sais de ^{6}Li devido à diferenças nas taxas de transporte celular não apresentam atividade para esse tipo de doença. Já o estado de oxidação afeta profundamente a toxicidade de determinados elementos. Enquanto o Cr (III) é importante na dieta de humanos e animais por estar relacionado com o metabolismo de glicose, lipídeos e proteínas, o Cr (VI) é tóxico, carcinogênico e mutagênico (Templeton, 2000, Matos *et. al.*, 2008).

A distribuição de um elemento entre diferentes compostos inorgânicos pode afetar sua bioacessibilidade ou seu transporte devido a determinadas propriedades como cargas, solubilidade e coeficiente de difusão. Como exemplo, pode-se citar o sulfato de bário, que é usado como contraste artificial aos procedimentos de exames radiográficos do sistema digestivo, enquanto que o carbonato de bário pode se tornar solúvel no estômago devido à formação de cloreto de bário. Esse entra na corrente sanguínea e interfere em diversos processos metabólicos, sendo por isso considerado tóxico (Templeton, 2000, Gonçalves, 2007).

Compostos organometálicos são definidos como compostos contendo ligação covalente entre carbono e outros elementos diferentes de H, C e alguns gases, sendo metais e semimetais os ligantes mais comuns neste tipo de compostos. A alquilação desses elementos geralmente aumenta sua toxicidade No caso do mercúrio, por exemplo, o Hg (II) afeta rins de mamíferos e é corrosivo para sítios de absorção via mucosa. Entretanto o metilmercúrio é potencialmente mais tóxico, sendo um agente teratogênico, atigindo o sistema nervoso central. O arsênio por outro lado tem sua toxicidade diminuída nas formas alquiladas, os compostos inorgânicos são aproximadamente 100 vezes mais tóxicos do que as formas parcialmente metiladas (MMA e DMA) (Barra *et. al., 2000*).

Outro grupo importante de compostos a serem separados por especiação são as macromoléculas. Estes compostos são o maior nível estrutural ao qual as análises de especiação são consideradas. Em análises ambientais, por exemplo, ácidos húmicos e fúlvicos e partículas coloidais são consideradas por proporcionar meios para transporte e disponibilidade de elementos como Cd, Cu e Pb. Estudos da interação entre metais de transição e moléculas de DNA atraem atenção de pesquisadores devido à importância no desenvolvimento de enzimas de restrição

sintéticas, drogas quimioterapêuticas e agentes marcadores. As metaloproteínas, além do que foi abordado anteriormente são responsáveis por muitos processos metabólicos como expressão e regulação genética, funções catalíticas, transporte e armazenamento, entre outras. (Templeton, 2000, *Garcia*, 2006, Arockiasamy *et. al.*, 2009).

Para o estudo de especiação, é freqüente a utilização de técnicas cromatográficas de separação e é imperativa a utilização de um sistema sensível de detecção. Dois tipos de acoplamentos separador-detector são usualmente considerados: (a) acoplamentos on-line de técnicas com colunas de separação, tais como cromatografia líquida (LC, *Liquid Chromatography*) ou eletroforese capilar, acoplado a detectores tais como espectrometria óptica de emissão com plasma de argônio induzido (ICP OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) ou espectrometria de massa com plasma de argônio induzido (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) e (b) separação off-line por gradiente de eletroforese em gel ou isoelétrica e detecção pelas técnicas anteriormente citadas ou ainda por espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GFAAS, Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) (Gómez-Ariza *et. al.,* 2004).

3.8 *Métodos de Separação*

3.8.1 Cromatografia líquida por exclusão de tamanho

Uma das maiores vantagens da cromatografia líquida é a grande flexibilidade de mecanismos de separação, com o uso de diferentes fases móveis e estacionárias, abrangendo quase todas as soluções necessárias para separação de espécies de diversos elementos. Diferentes técnicas de separação por cromatografia líquida podem ser utilizadas, tais como cromatografia líquida por exclusão de tamanho (SEC, Size Exclusion Chromatography), troca iônica (IEC, Ionic Exchange Chromatography), entre outras. O tipo de cromatografia a ser empregada vai depender da polaridade, solubilidade e massa molar das diversas espécies de interesse (Michalke, 2002).

Em cromatografia por exclusão de tamanho a retenção do soluto depende do tamanho molecular e não da massa molar. Neste tipo de separação, moléculas de tamanho muito grande não conseguem penetrar nos poros da fase estacionária, sendo excluídas e arrastadas pela fase móvel, através da coluna em um tempo

mínimo de análise. As moléculas que são suficientemente pequenas, migram por todos os poros da coluna, tendo um tempo de retenção máximo, e por conseqüência um tempo de residência muito maior na coluna, sendo essas as últimas a chegar ao detector. As moléculas médias têm penetração parcial nos poros, utilizam parte do volume do poro disponível e conseguem ser separadas das primeiras e assim sucessivamente, em função dos diferentes tamanhos (Collins *et. al.*, 2006).

Muitas vantagens são atribuídas a esse método, a massa molar de um composto pode ser caracterizada nesse sistema de calibração cromatográfico; é um método brando de separação, portanto normalmente não resulta em perdas de espécies ou alterações na coluna. Além disso, por não depender especificamente de interações químicas entre a coluna e o soluto para separação, a escolha do eluente não é tão crítica. Entretanto esse método de separação é mais comumente aplicado em análises de fracionamento. (Michalke, 2002).

As análises de fracionamento são um tipo particular de análise de especiação onde um grupo de analitos é classificado de acordo com uma propriedade física (ex. tamanho, solubilidade) ou química (ex. reatividade) (Templeton, 2000).

Um exemplo de aplicação da cromatografia de exclusão por tamanho pode ser encontrado no trabalho de Nascimento e colaboradores (2010), que utilizaram detectores de absorção molecular (UV) e absorção atômica (GFAAS) para avaliar a que frações protéicas os elementos Cu e Fe se encontravam ligados em amostras de castanha. Com o trabalho os autores puderam concluir que nas amostras estudadas o Fe estava ligado principalmente a duas frações de massa molar 9,2 e 28,2 kDa. Por outro lado, o Cu não pode ser determinado pelo sistema utilizado.

3.8.2 Eletroforese em gel

Outra técnica bastante empregada para análise de fracionamento por tamanho é eletroforese em gel. Trata-se de uma técnica que esta relacionada à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial (Silva Jr., 2004). Em proteínas, a espécie carregada pode ser produzida pela ionização do grupo ácido carboxílico, protonação do grupo amino ou ainda pelo revestimento uniforme da proteína com um surfactante aniônico, como dodecilsulfato de sódio (SDS, do inglês Sodium Dodecyl Sulfate). O SDS liga-se à maior parte das proteínas em quantidades aproximadamente proporcionais à massa molar da proteína, aproximadamente uma molécula de SDS para cada dois resíduos de aminoácido. O SDS ligado contribui com uma carga

líquida negativa, tornando a carga intrínseca insignificante e conferindo a cada proteína uma razão carga/massa semelhante, o que viabiliza a separação por tamanho. Além disso, a conformação nativa da proteína é alterada quando o SDS se liga conferindo a todas as proteínas uma conformação semelhante (Lehninger, 1984).

Em eletroforese, a espécie carregada se move em meio líquido, o qual é suportado por uma substância inerte (papel ou gel semi-sólido). O líquido serve como meio condutor para a corrente elétrica gerada por uma fonte de energia e aplicada no sistema por meio de eletrodos (Garcia, 2006).

Eletroforese em gel de poliacrilamida é considerada a técnica mais adequada para separação de proteínas (Mounicou & Lobinski; 2008). A poliacrilamida, que é o suporte nesse caso, é obtida por meio da polimerização da acrilamida monomérica, usando N,N`-metil bisacrilamida e fatores como tipo de iniciador, concentrações, pureza dos reagentes e temperatura, bem como a concentração de monômero e a de oxigênio e porosidade devem ser considerados. A escolha apropriada da concentração de acrilamida é fundamental para se obter uma boa resolução no gel. Outros fatores como pH e tipo de tampão também são importantes para a resolução (Garcia et al., 2006). A eletroforese em gel de poliacrilamida – PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) tem sido utilizada para resolver o problema de resolução na separação de proteínas. Portanto, um grande número de protocolos para géis e tampões, bem como de condições de separação têm sido empregados.

Do ponto de vista da eletroforese, as propriedades mais importantes das proteínas são o tamanho e a carga. Assim, as proteínas terão velocidades de migração diferentes, dependendo das condições eletroforéticas e serão separadas umas das outras por esta técnica (Garcia et al., 2006).

Tabilo *et. al.* (1999), utilizaram SDS-PAGE (10% poliacrilamida) para avaliarem o perfil de degradação protéica de presuntos de variada qualidade curados durante 12 meses à seco. As bandas eletroforéticas foram reveladas com coomassie brilliant blue. Segundo os resultados dos autores, durante o processo de coração as bandas relativas à α-actinina e miosina quase desapareceram nas amostras, sendo que houve um aparecimento de outras duas no lugar de massa molar de 150 e 85 kDa. Titina, nebulina e troponina T também tiveram uma grande redução durante o processo. Produtos de quebra entre 40 e 14,4 kDa também

apareceram. Os autores ainda inferem que os fragmentos 150 e 85 kDa podem ser usados como marcadores na otimização do processo de texturização.

3.9 *Métodos de Detecção*

3.9.1 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)

O plasma é um gás parcialmente ionizado onde co-existem elétrons livres e íons positivos em movimento, podendo ser formado quando gás argônio passa por uma tocha de quartzo e é aplicada uma descarga elétrica por uma bobina de Tesla. A partir daí, os elétrons livres são acelerados por um campo eletromagnético alternado, colidem com átomos e transferem sua energia para o gás. Os plasmas de argônio apresentam densidades eletrônicas de aproximadamente 10^{15} elétrons por cm^3 e temperaturas entre 6000 e 10000 K. A solução que é introduzida num ICP OES é previamente transformada em aerossol por um nebulizador comumente pneumático, sendo que uma pequena fração desse aerossol (em geral menor do que 5%) é selecionada por uma câmara de nebulização e chega até o plasma. Neste ponto, processos de dessolvatação, dissociação de moléculas, atomização e excitação dos átomos ocorrem. Quando os átomos ou íons excitados retornam ao estado fundamental a radiação emitida é conduzida através do sistema óptico do equipamento e convertida em impulso elétrico por meio de um detector de estado sólido. Dessa forma é obtido o espectro atômico dos elementos (Trevizan, 2007; Montaser & Golightly, 1992).

Devido à alta temperatura do plasma, esses são usados quase que exclusivamente como emissão atômica.

Esta técnica possui várias vantagens, como a relativa facilidade de manuseio, seu caráter multielementar, além de possuir uma grande facilidade de acoplamento com técnicas de separação como cromatografia líquida de alta eficiência, o que é um grande atrativo para a realização de análises de especiação. Contudo, a elevada sensibilidade requerida acaba por limitar o uso do ICP OES para esse tipo de análise. Em função disso, espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) tem sido cada vez mais empregada para especiação, visto que proporciona todas as vantagens do ICP OES além de elevada sensibilidade.

3.9.2 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é uma técnica poderosa para a determinação de elementos traço particularmente em eluatos cromatográficos quando em análise de especiação química (*Michalke, 2002*). O princípio de operação básico da técnica requer que a amostra, em geral na forma líquida, seja bombeada até um nebulizador onde é convertida em um aerossol fino por meio de um fluxo de gás argônio. As menores gotas do aerossol, que representam de 1 a 2% da amostra, são então separadas das gotas maiores na câmara de nebulização. O aerossol resultante é transportado até o plasma de argônio. No plasma são geradas partículas carregadas. Assim que são geradas, são carregadas até o espectrômetro de massa por via de uma região de interface, que é mantida a baixa pressão de 1-2 torr com uma bomba mecânica. Essa interface consiste de dois cones metálicos, chamados de cone amostrador e skimmer, cada um com um pequeno orifício (0,6-1,2mm) que permitem a passagem dos íons. Uma vez que os íons atravessem com sucesso a região de interface, vão diretamente para a câmara de vácuo principal, focalizados por meio de uma série de lentes eletrostáticas chamadas de lentes ópticas, que também tem por função parar os fótons gerados no plasma e consequentemente diminuir o sinal de fundo das análises. Nessas lentes são aplicadas diferenças de potenciais específicas para manter o íon de interesse no centro do feixe de íons, diminuindo assim a perda devido à repulsão gerada entre íons de mesma carga. O feixe de íons contendo todos os analitos é então direcionado ao dispositivo de separação de massas, que opera em baixa pressão (aproximadamente 10-6 torr), obtida com a utilização de uma bomba turbomolecular (Thomas, 2008).

Existem muitos analisadores de massa, sendo o quadrupolo um dos mais comuns e baratos. Todos os analisadores têm o mesmo propósito, que é o de permitir que o íon de interesse de massa e carga definida alcance o detector, filtrando interferentes e íons da matriz que não interessem à análise. Por fim, os íons são convertidos em um sinal elétrico com um detector de íons, sendo o mais comum atualmente o detector de dinodo discreto (Thomas, 2008).

Muitas são as vantagens proporcionadas pela utilização do ICP-MS. Limites de detecção da ordem de ng kg^{-1} são alcançados devido à geração de uma grande quantidade de íons positivos no plasma. Esses limites podem ainda ser melhorados

com a utilização de câmaras de reação ou colisão para eliminação de interferências, sendo que com essa possibilidade os limites podem chegar à ordem de pg kg^{-1}. A faixa analítica de trabalho pode variar de ng kg^{-1} até mg kg^{-1}, reduzindo a manipulação da amostra e minimizando potenciais erros. Como já dito anteriormente, a técnica ICP-MS é multielementar e rápida, tal qual ICP OES, um analisador quadrupolo pode determinar cerca de 30 elementos em poucos minutos (Thomas, 2008).

Contudo, pouca ou nenhuma técnica é livre de interferências. Em ICP-MS, essas são classificadas em três grandes grupos: isobáricas, de matriz e física (Thomas, 2008).

As interferências isobáricas são as mais sérias, principalmente causadas por espécies poliatômicas ou moleculares e são produzidas pela combinação de dois ou mais íons como associações do gás usados na nebulização/geração do plasma (Ar) e componentes da matriz no solvente. Por exemplo, a combinação $^{40}Ar^{35}Cl^{+}$ de gás argônio com ácido clorídrico provindo da matriz pode interferir no isótopo 75 de As; ou óxidos formados por concomitantes da amostra combinados com H^{+}, $^{16}O^{+}$ ou $^{16}OH^{+}$ esse tipo de interferência é mais comum na zona fria do plasma próxima à região de interface e são mais sérias na presença de elementos refratários que formam espécies moleculares mais facilmente. Íons de dupla carga também são dependentes das condições do plasma e causam sobreposições espectrais em íons com a metade de sua massa. Por fim, interferências isobáricas causadas por elementos de mesma razão massa carga como nos isótopos ^{50}V, ^{50}Cr e ^{50}Ti (Thomas, 2008).

As interferências de matriz são basicamente de três tipos. A mais simples é chamada efeito de transporte da amostra e é causada basicamente pelo impacto da amostra na formação do aerossol no nebulizador ou na seleção do tamanho das gotas na câmara de nebulização. O segundo tipo é causado quando a amostra afeta a ionização da descarga do plasma. Neste tipo de interferência o sinal é suprimido devido às variações nas concentrações de componentes da matriz, podendo provocar alterações nas características do plasma entre a leitura das amostras e curva de calibração ou entre amostras distintas. Por fim a interferência causada pelo efeito de carga - espaço. Nesse caso os íons de menores massas tendem a ficar na parte externa do feixe de íons, na maioria positivos. Portanto, quando em presença

de íons de maior massa são repelidos, provocando perda de sinal e por consequência diminuição de sensibilidade analítica (Thomas, 2008).

Diversas são as formas de tentativas de correção para interferências. Remoção da matriz por precipitação ou métodos cromatográficos, quando a concentração de sais é alta, equações matemáticas de correções para interferências isobáricas ou poliatômicas menos severas (Thomas, 2008).

Utilização de condições instrumentais mais brandas, buscando um plasma menos energético visando uma menor concentração de íons de dupla carga,, espécies atomizadas ou interferentes poliatômicos de gases presentes no plasma (“Cool” plasma) pode ser considerado para determinação de Ca ($^{40}Ar^+$,$^{40}Ar^1H^+$), Fe ($^{40}Ar^{16}O^+$), Se ($^{40}Ar^{40}Ar^+$), As ($^{40}Ar^{35}Cl^+$), Cr ($^{40}Ar^{12}C^+$), entre outros (Thomas, 2008).

Células de colisão e reação utilizam determinados gases inertes para promover colisões ou reações com ions-moléculas para remover interferências poliatômicas e moleculares antes de entrarem no analisador (Thomas, 2008). Essas células podem estar presentes fisicamente no aparelho, como a célula de reação dinâmica (DRC, do inglês Dinamic Reaction Cell), presente antes do analisador e após as lentes iônicas onde os gases são inseridos para promover a reação ou colisão com os interferentes, ou como a interface de colisão e reação (CRI, do inglês Colision Reaction Interface), onde os gases podem ser inseridos na interface entre o plasma e o analisador de massas através do sampler ou skimmer. O equipamento utilizado nesta tese era equipado com CRI.

Por fim, as interferências de matriz são classicamente compensadas por padronização interna (Thomas, 2008).

Pereira *et. al.* (2010), avaliaram a utilização de interface de colisão e reação (CRI, colision reaction interface) para eliminação de interferências espectrais em análises de Se e As por ICP-MS. Foi observado no trabalho que a introdução de H_2 através do skimmer é o meio mais efetiva para determinação desses elementos. Os autores obtiveram boas recuperações em materiais de referência certificado de ostra e mexilhão nas condições descritas utilizando fluxo de H_2 de 80 mL min^{-1}.

Patterson *et. al.* (1999), utilizaram ICP-MS com analizador quadrupolo operando em condição de “cool” plasma, potência de radiofreqüência do plasma de 650 W, para analisar isótopos estáveis de Ca em amostras biológicas enriquecidas com ^{42}Ca e ^{44}Ca. Segundo os autores, a utilização desse artifício promove a redução de interferências poliatômicas ($^{40}Ar^1H^+$, $^{12}C^{16}O_2^+$) e interferências de dupla carga

^{87}Sr, possibilitando assim a medida dos diferentes isótopos de Ca sem necessitar de um equipamento de maior resolução. Contudo é enfatizado no trabalho que apesar da contribuição do “cool” plasma para essa determinação, ainda há a necessidade de uma amostra “clean”, ou seja, com a menor interferência da matriz possível, visto que a utilização deste artificio para análise não elimina completamente as interferências.

Fialho *et. al.* (2011) otimizaram um método para análise de ^{63}Cu com principal interferência isobárica $^{40}Ar^{23}Na$ em ICP-MS utilizando “cool” plasma em conjunto com a CRI. A melhor condição apresentada foi com potência de radiofrequência de 0,8 kW, profundidade amostral de 8,5 mm e fluxo de 20 mL min^{-1} de H_2 na CRI através do skimmer. Em todos os materiais de referência testados, as condições propostas foram mais eficientes quando comparadas ao método padrão ou com apenas à utilização da CRI.

3.10 *Preparo de amostra*

O preparo da amostra é outro parâmetro bastante crítico em especiação, visto que é necessária a extração dos analitos de interesse sem que ligações ou interações entre esses analitos e outros constituintes da amostra sejam afetadas. Para esse fim, em geral sucessivas extrações químicas da amostra são realizadas com diversos extratores, sendo esses selecionados para proporcionar um aumento na capacidade de extração (Arruda, 2007). Portanto, uma relação entre preparo de amostra eficiente e procedimentos de extração brandos, para manter a integridade dos analitos é imperativo, especialmente em se tratando de biomoléculas.

Para análises de metaloproteínas, estas devem ser extraídas da matriz biológica livres de qualquer substância que poderia causar interferência nas técnicas analíticas e mantidas em solução durante todo o processo de separação. Para isso, em primeiro lugar a ruptura da célula é realizada. Em matrizes sólidas, moagem ou homogeneização mecânica são empregadas para esse fim. A extração é usualmente realizada com uso de solução tampão contendo surfactante, agentes redutores e inibidores de proteases, de acordo com a amostra a ser analisada (Sussilini, 2007).

Wani *et. al.* (2008) otimizaram o método de extração de proteínas em amostras de semente de melancia utilizando o método de superfície de resposta. Quatro variáveis foram avaliadas neste trabalho, temperatura 40-60^{o}C, concentração de NaOH 0,03-0,15 g L^{-1}, tempo de extração 5-25 min e razão entre volume de

extrator e massa de amostra 30:1 - 70:1 (v:m). Agitação magnética foi empregada. Os autores realizaram uma etapa de filtração após cada experimento. A concentração de proteína extraída foi determinada pelo método de Lowry. As condições otimizadas nesse trabalho foram de 15 min de extração, com solução 0,12 g L^{-1} NaOH (70:1, v:m) à 40 ^oC. O rendimento obtido foi de 81,52 g de proteínas/100 g de amostra. Os valores de proteína total da mistura não foram apresentados.

Park *& Bean* (2003), propuseram um método de extração de proteínas em sorgo. Para isso eles avaliaram vários fatores, tipo e concentração de agente redutor, tipo e concentração de surfactante, concentração e pH da solução tampão e razão massa de amostra solvente. As conclusões mais relevantes apresentadas pelos autores foram que o surfactante aniônico (dodedilsulfato de sódio) foi mais eficiente no processo de extração do que o zwitterionico ou catiônico e soluções básicas são mais eficientes do que as neutras ou ácidas.

Materiais e métodos

4 Procedimento Experimental

4.1 *Instrumentação*

Os seguintes equipamentos foram empregados durante o desenvolvimento desta tese:

Espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES) com visão radial (Varian Vista RL, Austrália), empregado para a determinação de teores totais de cálcio, cobre, ferro, magnésio e zinco. Os parâmetros instrumentais estão descritos na Tabela 4-1.

Espectrômetro de massas com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS) com analisador quadrupolo (Varian820-MS, Australia). Os parâmetros instrumentais estão descritos nas Tabelas 4-2 e 4-3. Sistema de focalização com analisador e plasma em arranjo de 90^o. Interface CRI composta por cones modificados que permitem a introdução de gases H_2 e He.

Forno de micro-ondas com cavidade (Multiwave®, Anton Paar GmbH, Áustria).

Sistema de propulsão de fluídos à altas pressões (Varian, Prostar 210, Austrália).

Injetor comutador para cromatografia líquida com alça de amostragem 100 μL (Rheodyne, 9725i, EUA).

Coluna de exclusão por tamanho Superdex 75 10/300 GL (Tricorn, Inglaterra).

Seringa para cromatografia liquida de 250 μL.

Espectrofotômetro de absorção molecular UV-VIS (Femto, 700 plus, Brasil). Cubeta para análise em fluxo com janela de quartzo caminho óptico de 1 cm.

Computador Pentium 233 com software do equipamento para aquisição dos dados cromatográficos por UV.

Cuba de vácuo (Agilent, EUA).

Filtros para seringa (Millipore, Millex-HV 0,45 μm, EUA)

Bomba de vácuo (Fisatom, 825 T, Brasil)

Agitador micro placas (Marconi, MA 562, Brasil)

Liofilizador (microModulyo, EUA).

Moinho criogênico (Marconi MA 775, Brasil).

Centrífuga (Fanem 206-R, Brasil).

Sistema para destilação de ácido em sub-ebulição (Marconi, Brasil).

Fonte de energia para eletroforese (Amersham Biosciences, EUA)

Célula de eletroforese (Bioamerica, modelo D7C2-24DNBA,EUA)

Tabela 4-1 Parâmetros empregados na análise por ICP OES

Parâmetros Instrumentais	**ICP OES (visão radial)**
Potência da rádio freqüência (kW)	1,3
Vazão do nebulizador (L min^{-1})	0,6
Vazão do gás do plasma (L min^{-1})	15
Vazão do gás auxiliar (L min^{-1})	1,5
Nebulizador	V-Groove
Câmara de nebulização	Sturman Master
Altura de observação mm	15
Comprimento de onda (nm)	Ca (II) (λ = 396,847 nm)
	Cu (I) (λ = 327,395 nm)
	Fe (II) (λ =238,204 nm)
	Mg (II) (λ = 280,270 nm)
	Zn (II) (λ = 213,857 nm)

Tabela 4-2 Parâmetros empregados na análise por ICP-MS condições normais

Parâmetros Instrumentais	**ICP-MS**
Potência da rádio freqüência (kW)	1,4
Vazão do nebulizador (L min^{-1})	0,93
Vazão do gás auxiliar (L min^{-1})	0,93
Vazão do Sheath gás (L min^{-1})	0,19
Nebulizador	Seaspray
Câmara de nebulização	Scott type
Pontos por pico	5
Tempo de residência (µs)	100 000 Se , 50 000 outros
Skimmer	Ni
Vazão H_2 (mL min^{-1})	80
Vazão He (mL min^{-1})	80
Temperatura da câmara de nebulização (^oC)	2
Tipo de varredura	Peak Hopping

Tabela 4-3 Parâmetros empregados na análise por ICP-MS condições de cool plasma

	Cool Plasma 1	**Cool Plasma 2**
Potência da rádio freqüência (kW)	0,7	0,65
Vazão do nebulizador (L min^{-1})	0,98	1,07
Vazão do gás auxiliar (L min^{-1})	0,93	0,93
Vazão do Sheath gás (L min^{-1})	0,19	0,19
Nebulizador	Seaspray	Seaspray
Câmara de nebulização	Scott type	Scott type
Pontos por pico	5	5
Tempo de residência (µs)	100 000 Se , 50 000 outros	100 000 Se , 50 000 outros
Skimmer	Ni	Ni
Vazão H_2 (mL min^{-1})	80	80
Vazão He (mL min^{-1})	80	80
Temperatura da câmara de nebulização (^{o}C)	2	2
Tipo de varredura	Peak Hopping	Peak Hopping

4.2 *Reagentes*

Todos os materiais (vidrarias, ponteiras, frascos, etc) utilizados para a realização do trabalho foram descontaminados em banho de HNO_3 10% (v v^{-1}) por 24 h. Água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩcm), obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q plus (Millipore, Estado Unidos) foi empregada para todas as diluições, preparo de amostras e limpeza de vidraria. Os padrões foram preparados a partir de soluções estoque individuais contendo 1000 mg L^{-1} (Tritisol®, Merck, Alemanha) de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn. Ácido nítrico HNO_3 (Merk, Alemanha) destilado abaixo do ponto de ebulição e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Merck, Alemanha) foram utilizados como agentes oxidantes na digestão das amostras.

Fosfato de sódio dibásico (Synth, Brasil), Tris-(hidroximetil)aminometano (USB, EUA), Dodecilsulfato de sódio (Vetec, Brasil), Brometo de cetiltrimetilamônio (Vetec, Brasil) e Triton X-100 (J. T. Baker, EUA), foram utilizados nos estudos cromatográficos. Para preparo dos tampões, o pH era aferido utilizando HNO_3 (1% m

v^{-1}) ou NaOH (1% m v^{-1}) (Vetec, Brasil) e um potenciômetro (Tecnal Tec-2, Brasil) com eletrodo combinado de pH (Analion V631-5, Brasil).

Para a calibração da coluna de exclusão por tamanho, padrões de diferentes massas molares (GE Healthcare, EUA), Blue Dextran (2000 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Cianocobalamina (1,4 kDa), foram empregados.

Antes de qualquer injeção na coluna cromatográfica as amostras ou padrões eram filtrados com filtros 0,45 µm com auxílio de uma cuba originalmente utilizada para SPE e bomba de vácuo para evitar que qualquer sólido ou suspensão fosse injetada na coluna cromatográfica e comprometesse seu empacotamento. Para evitar interferência entre as análises sucessivas, tampão de corrida era injetada na coluna entre uma análise cromatográfica e outra.

4.3 *Amostras*

Para a otimização dos métodos de extração foram utilizadas amostras de rim de bovino fornecido pelo laboratório de carnes da Embrapa Pecuária Sudeste e amostra comercial de contra-filé (*Longissimus dorsi*) comprada em mercado local de São Carlos, SP, sendo que a mesma amostra comercial de contra-filé também foi utilizada para otimização das condições de detecção de ICP-MS e ICP OES. Por fim, amostras de contra-filé de animais da raça Wagyu com diferentes períodos de maturação foram fornecidas pelo laboratório de carnes da Embrapa Pecuária Sudeste para posteriores estudos sobre períodos de maturação e aplicações dos métodos desenvolvidos.

4.4 *Determinação dos teores totais dos íons metálicos*

As amostras de carnes trituradas foram liofilizadas por 24 horas e posteriormente pulverizadas em moinho criogênico usando recipiente imerso em nitrogênio líquido (SPEX), sendo que foi aplicado o seguinte programa para a moagem (dividido em 3 ciclos): Etapa 1. pré-congelamento: 4 min; Etapa 2. moagem: 2 min, intercalados por ciclos de recongelamento de 2 min. Os teores totais foram determinados nas amostras empregando forno com radiação micro-ondas para mineralização das amostras. Aproximadamente, 100 mg das amostras de interesse e de material certificado de referência (NIST 8414–Bovine Muscle Powder) e Bovine Liver (NIST 1577b), foram utilizados.

Volumes de 1,0 mL de H_2O_2 (30% m/m) e 2,0 mL HNO_3 (7 mol L^{-1}) foram utilizados nas digestões. Após realizadas as digestões, as amostras foram diluídas

para 10 mL com água ultrapura e os teores de cálcio, cobre, ferro, magnésio e zinco foram determinados por ICP OES. Na Tabela 4-4 está descrito o programa de aquecimento utilizado durante a digestão e na Tabela 4-1 as condições utilizadas no ICP OES.

Tabela 4-4 Programa de aquecimento em forno de micro-ondas com cavidade

Etapas	Potência (W)	Tempo (min)
1	300	2,0
2	0	3,0
3	650	4,0
4	850	5,0
5	1000	5,0
6	Vent.	15,0

4.5 *Análises cromatográficas*

4.5.1 Sistema SEC-UV

Para a calibração da coluna cromatográfica de exclusão por tamanho foi utilizada detecção por absorção no ultravioleta com comprimento de onda 290 nm (UV). O sistema consistiu de uma bomba de propulsão de fluídos em alta pressão, injetor comutador tipo Reodhyne, coluna cromatográfica, espectrofotômetro de absorção no UV equipado com cubeta de fluxo com janela óptica de quartzo e um computador, onde foi instalado o software do equipamento para aquisição das medidas de absorbância em função do tempo.

Com a utilização de uma seringa (250 µL) a alça (100 µL) do injetor comutador na posição amostragem era preenchida com um padrão de massa molar. Quando o injetor era comutado para posição injeção, o padrão de massa molar era colocado no percurso do eluente e bombeado pelo sistema de propulsão de fluidos. Dessa maneira a solução de padrão era bombeada através da coluna cromatográfica onde esta migrava pelos poros da coluna. Após sair da coluna o padrão era transportado até o detector, onde era obtido um sinal de absorbância. Esse sinal era adquirido continuamente a partir do momento da injeção do padrão no eluente até sua completa transposição pelo detector, segundo a segundo. Dessa forma era obtido um sinal de linha de base próximo a zero quando havia só o

eluente passando pelo caminho óptico, ou seja do início da análise até instantes antes da chegada do padrão ao detector, e um pico de absorbância quando havia o eluente em conjunto com padrão padrão passando pelo caminho óptico do detector. O tempo de aquisição desse pico era considerado o tempo de retenção do padrão de massa molar na coluna. Esse processo foi repetido para todos os padrões.

Após a aquisição dos dados os cromatogramas foram gerados utilizando o software Origin 8.0 (OriginLab, EUA). Devido às limitações de pressão recomendadas pelo fabricante da coluna cromatográfica, a pressão do sistema era mantida no máximo de 15 bar. Para o início de trabalho com a coluna cromatográfica era passado um fluxo de água por 90 min e posterior condicionamento de 90 min com tampão de corrida e ao final das análises era feita a limpeza com 90 min com água e em seguida 90 min com álcool metílico (20% v v^{-1}), meio no qual a coluna era mantida.

4.5.2 Sistema SEC-ICP-MS / SEC-ICP OES

Para análise das metaloproteínas foi avaliada a detecção por ICP-MS e ICP OES. O sistema utilizado foi basicamente o mesmo descrito no item anterior, exceto a detecção. Após a separação pela coluna a amostra era transportada até o nebulizador dos ICPs avaliados, onde ocorria a nebulização da amostra, transporte até o plasma, os processos de atomização e ionização que normalmente ocorrem no plasma e a aquisição do sinal. O sinal era adquirido continuamente a partir do momento da injeção nos modos “time scan” para o ICP OES e “Peak Hopping” para o ICP-MS, tal qual quando utilizado o espectrofotômetro de absorção no UV. O software utilizado para a aquisição de sinal foi o Vista (Varian, Australia) versão ICP OES ou ICP-MS, de acordo com a detecção que estava sendo avaliada. Após a aquisição dos dados os cromatrogramas eram gerados utilizando o software Origin 8.0 (OriginLab, EUA). Neste sistema não foram injetados padrões, mas apenas extratos das amostras.

4.6 *Determinação de Proteína*

4.6.1 Proteína Bruta

A determinação de proteínas geralmente é realizada com base na determinação de nitrogênio total, feita pelo processo de digestão Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004). Esse método, idealizado em 1883, tem sofrido

numerosas modificações e adaptações, porém sempre se baseia em três etapas: digestão, destilação e titulação. A matéria orgânica é decomposta e o nitrogênio existente é finalmente transformado em amônia. Como o teor de nitrogênio das diferentes proteínas corresponde a aproximadamente 16% do teor total de nitrogênio, normalmente é considerado o fator empírico 6,25 para transformar a massa de nitrogênio obtida em proteína.

Digestão – A matéria orgânica existente na amostra é decomposta com ácido sulfúrico e uma mistura catalisadora, normalmente K_2SO_4:$CuSO_4$ (10:1). Sulfato de potássio é adicionado para elevar a temperatura de ebulição e sulfato de cobre é adicionado para favorecer a decomposição da matéria orgânica.

Destilação – A amônia é liberada do sal amoniacal pela reação com hidróxido de sódio e recebida numa solução de ácido bórico de volume e concentração conhecidos formando borato de amônio ($NH_4H_2BO_3$).

Titulação – Determina-se à quantidade de nitrogênio presente na amostra titulando-se o $NH_4H_2BO_3$ na presença de indicador com uma solução conhecida de H_2SO_4.

Digestão- 0,100 mg da amostra é pesada e transferida a um tubo de digestão de 300 mL. A seguir são adicionados 1,5 g de mistura catalisadora e 2,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Em seguida os tubos são transferidos a um bloco digestor, elevando gradativamente a temperatura até atingir 400^{o}C, temperatura na qual é mantida por aproximadamente 3 horas, ou até que as paredes internas dos tubos estejam perfeitamente limpas, ou que a fumaça branca de SO_2 (dióxido de enxofre) praticamente desapareça. A digestão se completa quando a solução é transformada na coloração verde água transparente. A seguir os tubos contendo a solução das amostras são retirados do bloco digestor e transferidos para suporte adequado, onde são deixados esfriar.

Destilação - após o esfriamento, os tubos são conectados ao sistema de destilação semi-automático, cujo condensador esteja previamente conectado a um frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de solução de 1% mv^{-1} de H_3BO_3 e solução indicadora (solução 0,1% m v^{-1} de verde de bromocresol e solução 0,1 % m v^{-1} de vermelho de metila). À amostra são adicionados 25 mL de solução 40% m v^{-1} de NaOH, sendo a seguir iniciada a destilação até que o volume destilado seja de aproximadamente 50 mL.

Titulação - o destilado coletado é titulado com solução padronizada 0,1 mol L^{-1} de H_2SO_4.

A porcentagem de nitrogênio e porcentagem de proteína bruta das amostras são calculadas a partir das seguintes expressões:

% N = ((2 * 14 * 0,1 *100)/ 100) * (V H_2SO_4 – V branco) (1)

Onde:

14 = equivalente do nitrogênio

0,1 = concentração do ácido

100 = 100% (para expressar o resultado em porcentagem)

100 = massa utilizada (em miligrama – 0,100g * 1000)

V H_2SO_4 = volume de ácido consumido até o ponto de viragem (em mL)

V Branco = volume de ácido consumido até o ponto de viragem do branco (em mL)

% Proteína bruta = %N * 6,25 (2)

4.6.2 Método de Bradford

Para determinação da concentração total de proteínas nos diferentes extratos da carne foi empregado o método de Bradford (1976). Para isso, as proteínas da carne eram extraídas de acordo com cada método avaliado. Em seguida era realizada uma diluição 1:5 do extrato com o próprio extrator, para que este se encontrasse na faixa linear de calibração. Por fim, uma alíquota de 100 µl era retirada e adicionada a 1,00 mL do reagente de Bradford (Coomassie Brilhant Blue G-250 (CBG) em meio de álcool metílico e ácido fosfórico (85 % v v^{-1}) obtidos comercialmente (Thermo Scientific, EUA).

A ovoalbumina foi utilizada para calibração do espectrofotômetro. As soluções de referência foram preparadas a partir de uma solução estoque de ovoalbumina 5000 mg mL^{-1} em meio de água ultrapura. Todas as curvas foram compatibilizadas com o extrator e faixas de concentrações diferentes foram utilizadas dependendo dos reagentes empregados na extração. Quando apenas tampões eram empregados nas extrações, curvas de (50 – 500 mg L^{-1}) eram utilizadas. Em contrapartida, devido aos maiores valores de sinal de fundo quando surfactantes eram adicionados foi necessário aumentar a faixa de concentração dos padrões (1000 – 5000 mg L^{-1}). Nessas últimas também foi retirada a etapa de diluição do extrato.

4.7 *Extração da fase lipídica*

A extração da fase lipídica foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Gonçalves (2007) baseado no trabalho de Kannamkumarath e colaboradores (2005). O processo consiste na agitação de 2,0 g de amostra moída com uma mistura clorofórmio-metanol 2:1 (10 mL) por 5 min e posterior separação do sobrenadante do resíduo da amostra. Esse processo era repetido por 3 vezes e na última o extrato era filtrado. O resíduo da amostra que ficava retido no filtro era seco em estufa 37^{o}C por 24h, moído em almofariz com pistilo e realizada as extrações de proteínas.

4.8 *Eletroforese em gel*

A formação do gel por polimerização da acrilamida ocorreu no interior do sistema esquematizado na figura 4.1. A mistura reacional incluiu acrilamida (N,N'-metilenebisacrilamida) que funciona como cross-linker, 15 μL persulfato de amônio (10% m v^{-1}) usado como peróxido iniciador (a reação de polimerização da acrilamida é catalisada pela presença de radicais livres) e 5 μL TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) que atua como catalisador da reação. A exposição ao ar foi evitada durante a polimerização do gel de concentração por meio do encaixe do pente. A concentração da acrilamida nos géis determina a velocidade de migração e a capacidade de separação das proteínas. Num gel de densidade uniforme a distância de migração de uma proteína é inversamente proporcional ao logaritmo da sua massa molecular. Nesse trabalho foi utilizada concentração de acrilamida 15% (m m^{-1}) (e-escola, Instituto Superior e Técnico, acesso 01/09/11).

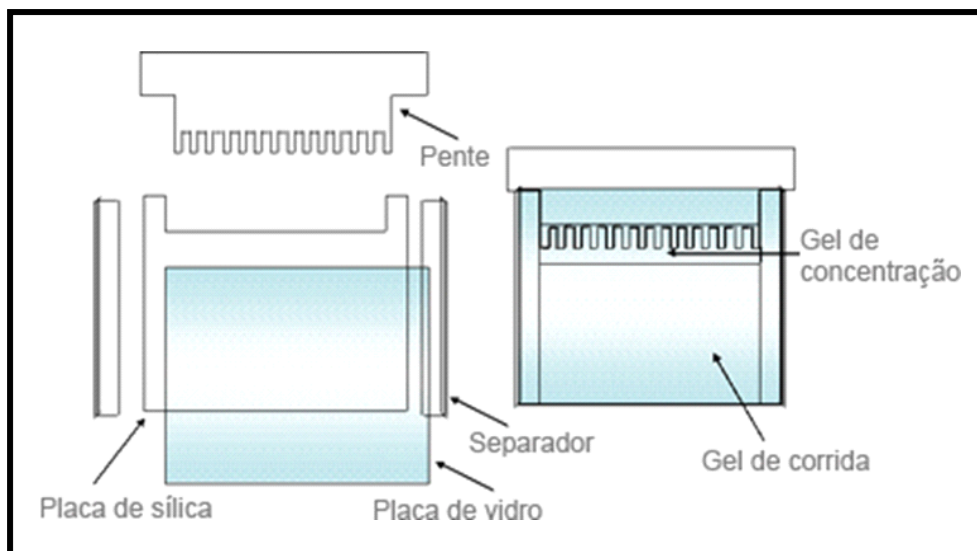



Figura 4-1 Representação do sistema de eletroforese em gel. (fonte: e-escola, Instituto Superior e Técnico, acesso 01/09/11).

A seguir, foi preparado o gel de empilhamento, da seguinte maneira: foram misturados 1,25mL de acrilamida/Bis e 1,875 mL de tampão do gel de empilhamento 6,06g de TRIS, 75 μL SDS (10% m v^{-1}), com pH ajustado para 6,8 em 100 mL de solução. Então, filtrou-se em papel-filtro a mistura e em seguida, adicionou-se 37,5 μL de persulfato de amônio e 15 μL de TEMED. Colocou-se os pentes e aguardou-se novamente 40 minutos para a completa polimerização.

Posteriormente, os pentes foram retirados com cuidado e onde os dentes dos pentes estavam encaixados formaram-se pequenas cavidades (poços), as quais foram usadas para a aplicação das alíquotas das amostras.

A solução de corrida (3,75 g de TRIS, 18,25 g de glicina em 250 mL de solução e em seguida diluída 5 vezes) foi colocada cuidadosamente nos poços com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, um volume de aproximadamente 40 μL dessa solução foi retirada de cada poço utilizando-se de uma seringa para a posterior injeção da amostra. Dessa maneira, o gel estava pronto para a análise eletroforética (Bossu, 2009).

Para o preparo das amostras foram misturados 32 μL dos extratos de carne com solução 8 μL de 2-mercaptoetanol. O reagente 2-mercaptoetanol atua como agente redutor, quebrando as ligações dissulfídricas presentes em grande parte nas proteínas. Isso se torna necessário para facilitar o acesso do desnaturante às partes internas das proteínas, além de permitir a separação de cadeias polipeptídicas mantidas por esta ligação covalente (SILVA Jr., 2001).

Em seguida, aplicou-se 40 μL das amostras nos poços da eletroforese em gel SDS-PAGE. Os mesmo preparos feitos com a amostra foram realizados com a solução padrão. Essa solução era comercial e continha os seguintes padrões protéicos: α – Lactalbumina (14 kDa), Inibidor Tripsina (20 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Albumina (66 kDa) e Fosforilase b (97 kDa).

Volumes restantes de tampão de corrida e eletrodos foram vertidos dentro da cuba, nas partes interna e externa. A tampa do conjunto foi encaixada, atentando para a conexão dos eletrodos e os fios destes ligado à fonte. Depois de seguir os procedimentos citados acima, utilizando-se uma fonte de energia aplicou-se uma voltagem de 100 V e amperagem de 23 a 24 mA por 4 horas e 30 min. A finalização da corrida foi indicada pela linha frontal que migra à frente das proteínas e formada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra. Dessa forma, quando a linha frontal estava ao final do gel fracionador, foi desligada a fonte elétrica (Bossu, 2009).

Após a corrida, para a revelação das bandas no gel, essas foram coradas em solução de azul brilhante de Comassie. O preparo dessa solução consistiu numa primeira etapa na mistura de 0,5 g de azul brilhante de Comassie 3,75 mL de H_2SO_4 em solução aquosa total de 500 mL. Em seguida, essa solução foi filtrada em papel filtro. Após, foi adicionado ao filtrado 55,6 mL de uma solução KOH (10 mol L^{-1}) juntamente com ácido tricloroacético (7,34 mol L^{-1}) e a solução resultante foi agitada por 2 horas.

Por fim, os géis foram lavados com água deionizada e armazenados em glicerol 10% (v/v) e metanol 10 % (v/v) em solução total de 100 mL (Bossu, 2009).

Resultados e Discussão

5 Resultados e Discussão

5.1 Avaliação do procedimento de extração

Para a realização das análises de fracionamento, foi necessário primeiramente aperfeiçoar os parâmetros inerentes à extração. Para isso, foram avaliados a concentração e tipo da solução tampão, tempo de extração, volume de extrator, influência da centrifugação e temperatura, o emprego de surfactantes e por fim o pH da solução extratora. O emprego de surfactantes e o pH foram avaliados por último por que foi buscada uma condição simples, branda e eficiente, pois variações nesses dois fatores poderiam prejudicar a estrutura do analito.

5.1.1 Avaliação da concentração da solução tampão

O primeiro fator que foi avaliado no procedimento de extração foi a concentração da solução tampão. Esse experimento teve por objetivo observar a influência que o aumento da concentração da solução tampão ocasionaria no perfil protéico extraído utilizando um sistema cromatográfico com SEC-UV (item 4.5.1). Para isso o sistema foi mantido na faixa da neutralidade (pH 7,0), visando uma menor influência no experimento.

Os experimentos foram realizados usando tampão fosfato na faixa de concentração de 0,75 – 5,00 mmol L^{-1} e tampão tris-HNO_3 (1,00 – 10,0 mmol L^{-1}). Uma solução de ovalbumina (5 g L^{-1}) era preparada em cada meio avaliado. A solução estudada também era usada para acondicionar a coluna cromatográfica. Cada condição avaliada foi medida duas vezes. Os resultados apresentados são as médias dessas medidas. Os cromatogramas obtidos são mostrados nas figuras 5-1 (tris-HNO_3) e 5-2 (fosfato).

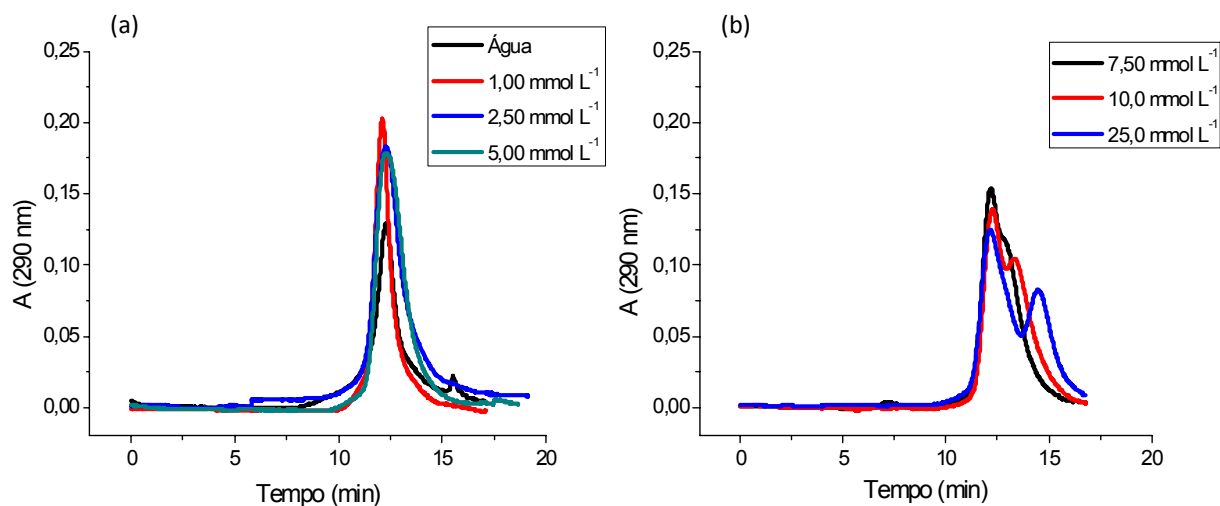



Figura 5-1 Cromatogramas de ovalbumina obtidos com tampão tris-HNO_3 pH 7,0 com concentrações crescentes. (a) 0 - 5,00 mmol L^{-1}; (b) 7,50 - 25,0 mmol L^{-1}

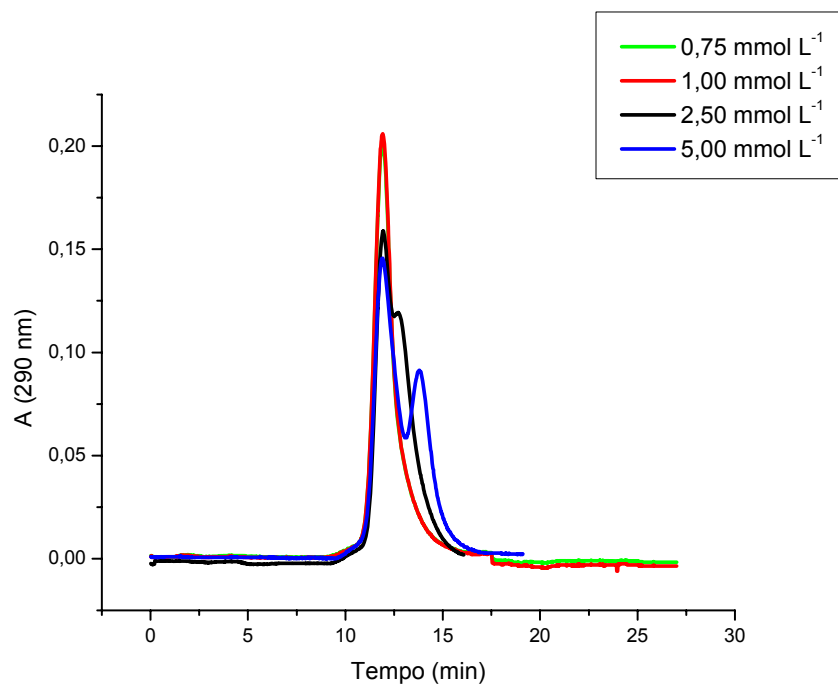



Figura 5-2 Cromatogramas de ovalbumina obtidos com tampão fosfato pH 7,0 com concentrações crescentes (0,75 - 5 mmol L^{-1}).

Como pode ser observado na figura 5-1 (a), o aumento da concentração da solução tampão provoca o alargamento dos picos cromatográficos para as soluções 2,50 e 5,00 mmol L^{-1}, quando comparadas à solução 1,00 mmol L^{-1}. Esse alargamento ocasiona também uma pequena diminuição da intensidade do sinal analítico. A partir da concentração de 7,50 mmol L^{-1} (figura 5-1 (b)), o pico

cromatográfico ganha definição novamente. Entretanto há uma diminuição mais acentuada do sinal analítico e o aparecimento de um segundo pico, o qual intensifica sua separação e intensidade com a elevação da concentração da solução tampão. Uma possível explicação para essas observações seria a degradação protéica a partir da concentração de 7,50 mmol L^{-1}. Quando água ultra-pura foi testada também houve diminuição do sinal analítico e aparecimento de um pequeno pico no tempo de 16 min (fig 5.1 (a)). Esse pico também pode ser referente à degradação da molécula de ovalbumina, decorrente da variação de pH da solução.

Quando o tampão fosfato foi avaliado, o comportamento observado foi o mesmo apresentado pelo tampão tris-HNO_3. Contudo, a concentração de 2,5 mmol $^{-1}$ já apresenta produtos de degradação.

Baseado no que foi apontado na discussão anterior e em estudos preliminares de Park & Bean (2003), que concluíram que a concentração da solução tampão não apresentaria efeito significativo na extração de proteínas, a concentração de 1,00 mmol L^{-1} foi selecionada para a realização dos experimentos posteriores.

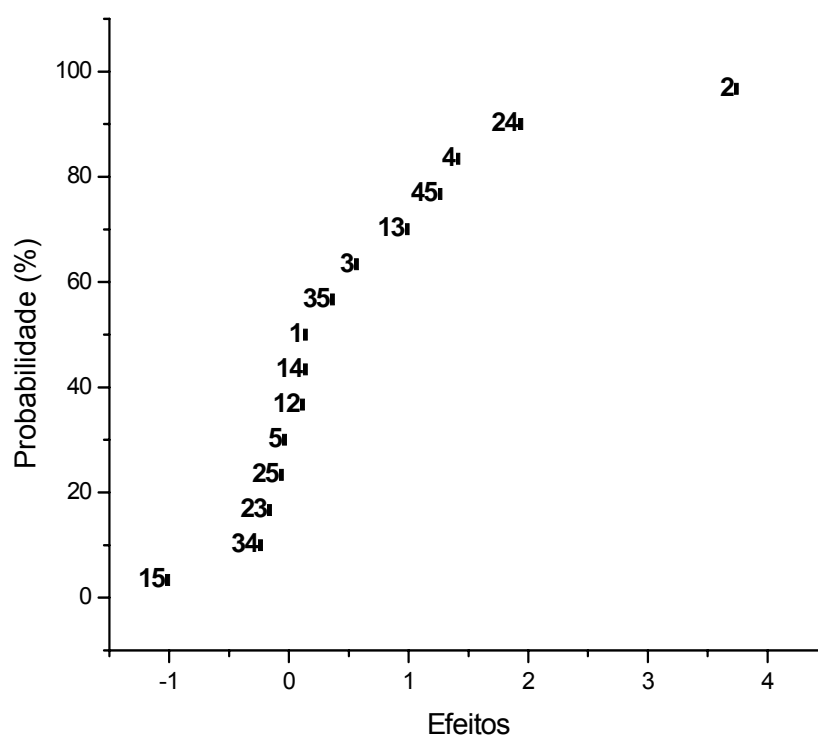
5.1.2 Planejamento fatorial fracionário

Após os testes iniciais com as concentrações da solução tampão foi realizado o processo de otimização da extração de metaloproteínas. Para isso foram utilizadas amostras de rim bovino liofilizadas e moídas em moinho criogênico. Buscando a otimização de extração das metaloproteínas, através da completa extração ou da fração proteica ou do grupo prostético, em todos os experimentos realizados foram determinadas a concentração de proteína extraída pelo método de Bradford (1976) e a concentração dos elementos de interesse por ICP OES. Para avaliação dos resultados, os valores extraídos foram comparados com as concentrações totais determinadas, digeridas por micro-ondas quanto a concentração total dos minerais e teor de proteína bruta estimado pelo método de Kjeldahl. Para esses experimentos, a amostra de rim foi selecionada em virtude do seu alto teor de minerais, facilitando a sua determinação por ICP OES. Contudo os resultados encontrados para as determinações de minerais não foram satisfatórios, sendo suas recuperações muito baixas, por isso os experimentos posteriores foram executados principalmente com os dados de proteínas totais.

O primeiro passo foi a realização de um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} sendo duas das variáveis estudadas, tipo de tampão e uso de centrifugação, qualitativas. O uso dessas variáveis levou a escolha de uma ou outra opção, sem opções intermediárias como, por exemplo, o uso de tampão tris ou tampão fosfato, composições intermediárias (misturas) não foram avaliadas. Na tabela 5-1 esta esquematizado o planejamento empregado. Como descrito anteriormente, os extratores utilizados foram tampão tris-HNO_3 e fosfato na concentração 1,00 mmol L^{-1} e pH 7,00.

Tabela 5-1 Planejamento fatorial fracionário 2^{5-1}

Experimento	Tempo (min)	Volume (mL)	Temperatura (°C)	Tampão	Centrifugação (g)
1	-1	-1	-1	-1	1
2	-1	-1	1	-1	-1
3	1	1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	1	-1	1	-1	1
6	1	1	1	1	1
7	-1	1	-1	-1	-1
8	1	-1	-1	-1	-1
9	1	-1	-1	1	-1
10	1	1	-1	1	-1
11	1	-1	1	1	-1
12	-1	-1	1	1	1
13	-1	1	1	-1	1
14	1	-1	-1	1	1
15	-1	1	-1	1	1
16	-1	1	1	1	-1
17	-1	-1	-1	-1	1
18	-1	-1	1	-1	-1
Nível (-)	15	5	Ambiente	Tris-HNO_3	-
Nível (+)	60	15	35	Fosfato	3000

A variável centrifugação foi avaliada para verificar possíveis perdas de analitos devido à sedimentação causada pela força centrifuga relativa gerada pela rotação. Além disso, optou-se por avaliar temperaturas relativamente baixas para que fossem evitadas possíveis mudanças estruturais nas proteínas extraídas por meio de desnaturação por temperatura. Com os resultados obtidos nos experimentos foi gerado um gráfico normal de efeitos (figura 5-3). Para avaliar os resultados, no gráfico normal de efeitos, considerou-se como relevante as variáveis mais distantes da origem no eixo dos efeitos, sendo essas as que mais influenciam na resposta analítica. Com isso, ficou evidente que apenas as variáveis tipo de tampão (4) e volume de extrator (2) foram significantes, assim como sua interação (24). É possível observar ainda que os níveis mais altos dessas duas variáveis proporcionam uma melhor extração das proteínas.

5-3 Gráfico de efeitos. Variáveis: 1 (tempo), 2 (volume), 3 (temperatura), 4 (tampão) e 5 (centrifugação).

Apesar de a interação entre as variáveis tempo - centrifugação (15), tempo - temperatura (13) e centrifugação - tipo de tampão (45) apresentarem valores de efeito relativamente elevados, admitiu-se, já que os efeitos principais dessas variáveis possuem valores muito baixos, que essas interações também não são significantes. Isso pôde ser confirmado após rearranjar o planejamento fatorial

fracionário 2^{5-1} em um planejamento fatorial completo 2^2 com 4 replicatas, observando a concordância entre as replicatas de cada experimento com erro relativo percentual variando entre 2,66 e 10,58%. A figura 5-4 mostra as médias das recuperações de cada experimento do planejamento 2^2 com seus respectivos desvios padrão.

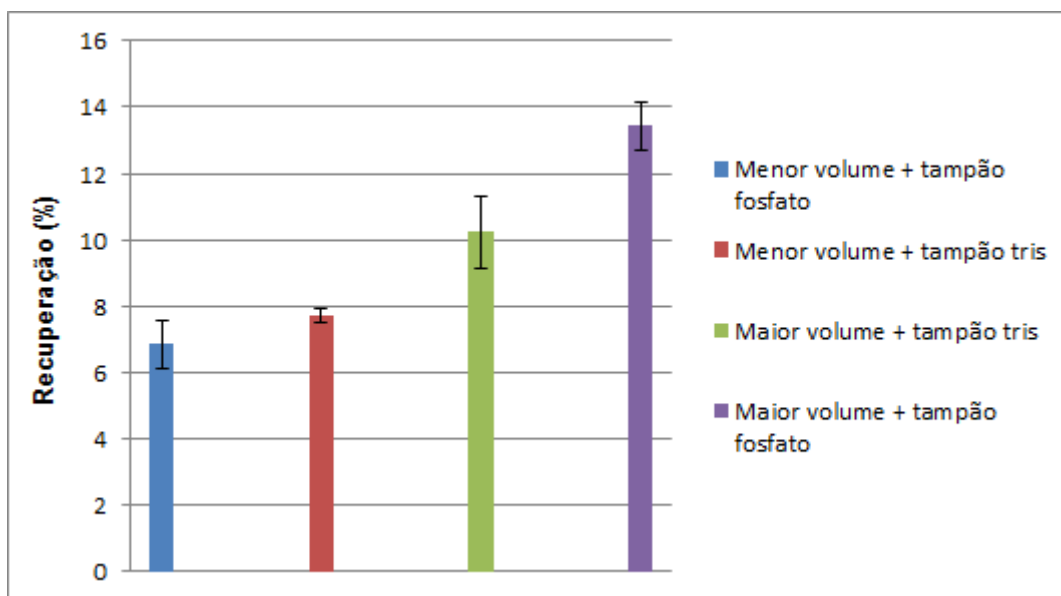



Figura 5-4 Representação gráfica do planejamento fatorial rearranjado 2^2 avaliando as variáveis tipo de tampão e volume do extrator.

Os valores de recuperação das proteínas em comparação com o método de Kjeldahl variaram entre 6 e 13%. Analisando-se, por meio do teste-*t* para duas médias no nível de 95% de confiança, a variável tipo de tampão e mantendo-se a variável volume constante, observou-se que não há diferença significativa quando avalia-se os experimentos de menor volume de extrator (barras azul e vermelha), todavia nos experimentos de maior volume (barras verde e roxa) foi observado diferença significativa, o que condiz com o gráfico de efeitos onde a interação entre a variável volume e tipo de tampão teve um elevado efeito positivo na extração.

Realizando-se o mesmo teste para a variável volume mantendo-se o tipo de tampão constante, observou-se diferença significativa para o tampão fosfato (barras roxa e azul). Não foi possível avaliar os experimentos realizados com tampão tris (barras vermelho e verde) devido ao resultado do teste F, no qual os desvios padrão das medidas não são comparáveis.

A partir desses resultados, foram selecionadas para os testes seguintes as condições: Tampão fosfato (1,00 mmol L^{-1}, pH 7,00), volume 15 mL, tempo 15 min, temperatura ambiente e uma etapa de centrifugação à 3000 rpm por 10 min. Apesar de ser clara a tendência de melhores valores de extração para maiores volumes de extrator, optou-se por não se trabalhar com essa variável para evitar maiores diluições da amostra e dificultar posteriores determinações de minerais.

Outra observação pertinente nesta etapa foi a formação de uma emulsão nos extratos de todos os experimentos, que impossibilita posteriores análises cromatográficas, provavelmente devido à alta concentração de lipídeos presentes na amostra (aproximadamente 46 % (m m^{-1})).

5.1.3 Avaliação do emprego de surfactantes

Buscando uma melhor homogeneidade do extrato e maior eficiência de extração, sem aumentar a diluição da amostra, decidiu-se avaliar o emprego de surfactantes, conforme proposto por Park & Bean (2003). Os autores estudaram entre outras variáveis a influência da concentração e o tipo de surfactante na extração de proteínas. Os surfactantes avaliados foram: catiônico: brometo de cetil trimetil amonio (CTAbr, do inglês Cetyl Trimethyl Ammonium – Bromide), aniônico: Dodecilsulfato de sódio (SDS, do inglês Sodium dodecilsulfate) e anfótero: SB 3-12 (SB, do inglês Sulfobetaine) e a amostra foi sorgo. Os autores concluíram que o dodecilsulfato de sódio foi o surfactante mais eficiente para extração de proteínas na amostra estudada.

Surfactantes são compostos pertencentes a uma classe denominada anfifílicas, ou seja, contendo uma parte hidrossolúvel e outra hidrofóbica (em geral uma cadeia carbônica). São usualmente utilizados como detergente, sabão, produtos de limpeza e higiene pessoal. Eles alteram a tensão superficial em virtude do aglomeramento de suas moléculas na interface entre dois meios imiscíveis, por exemplo, água e óleo, onde a parte hidrofílica fica na fase aquosa e a parte hidrofóbica na fase oleosa (Previdello *et. al.*, 2006).

Os surfactantes podem ser classificados de acordo com sua parte hidrofílica (cabeça polar), podendo ser catiônica (ex.: brometo de cetiltrimetilamônio ($R\text{-}N^+(CH_3)_3Br^-$)), aniônico (ex.: dodecilsulfato de sódio ($CH_3(CH_2)_{11}SO_4^-Na^+$)), não iônico (ex.: triton X-100 ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$)) ou ainda anfótero (ex.: 4- (dodecildimetil amônio) butirato ($CH_3(CH_2)_{11}N^+(CH_3)_2(CH)_3COO^-$)). Quando esses se encontram em

baixas concentrações no meio, estão na forma de monômeros, onde conforme descrito anteriormente a cabeça polar fica na fase polar e a cadeia carbônica na fase apolar. Quando a sua concentração é aumentada até uma concentração limite denominada concentração micelar crítica (CMC) há o aglomerado desses monômeros geralmente 50 – 100 moléculas onde, em meio aquoso, a cabeça polar fica voltada para fora as cadeias carbônicas para o centro. A esse aglomerado é dado o nome de micela (Previdelo *et. al.,* 2006, Bezerra & Ferreira, 2006).

Além da tensão superficial, outras propriedades do sistema podem ser alteradas, tais como densidade, viscosidade e pressão osmótica. Essas modificações podem ser vantajosas devido, dentre outros aspectos, ao aumento da solubilidade de substâncias em diferentes solventes, sendo essa a característica esperada neste trabalho (Bezerra & Ferreira, 2006).

A partir disso, foram avaliados 3 surfactantes: aniônico - dodecilsulfato de sódio, catiônico - brometo de cetiltrimetilamônio e não - iônico - Triton X-100 em três concentrações diferentes, sendo a primeira metade do valor da concentração micelar crítica (CMC), a própria CMC e o dobro do valor da CMC. As concentrações usadas para cada experimento estão apresentadas na tabela 5-2

Tabela 5-2 Parâmetros adotados para o estudo com surfactantes

	½ CMC* mmol L^{-1}	CMC mmol L^{-1}	2 CMC mmol L^{-1}
SDS	4,00	8,00***	16,0
Triton X-100	0,12	0,24 ***	0,48
CTABr	0,47	0,94**	1,88

* CMC – Concentração micelar crítica
** Previdello *ET. AL., 2006*
*** *Goheen & Matson, 1989*

Os resultados encontrados mostraram uma melhora bastante significativa. Os valores variaram de 6,10 à 34,5%. Os resultados são mostrados na figura 5-5.

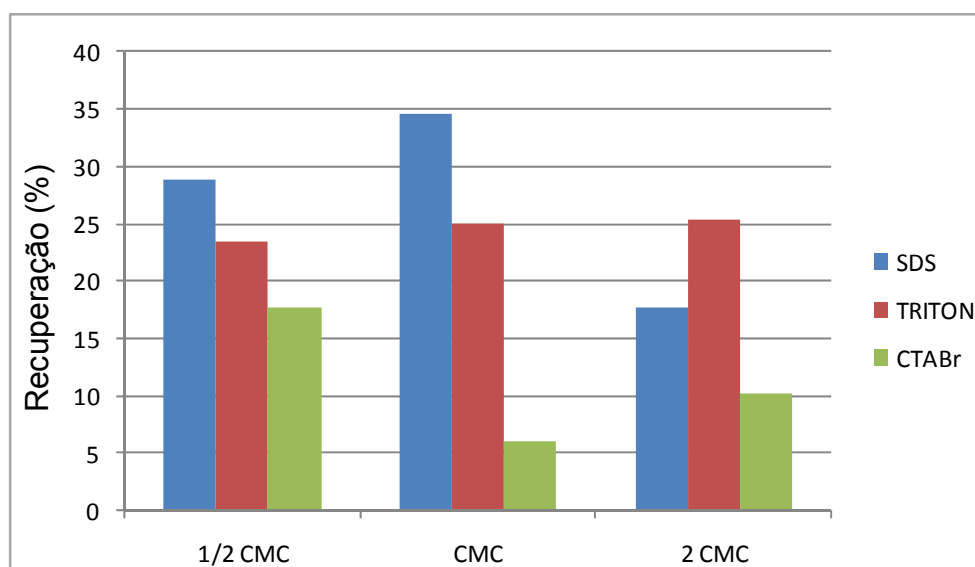



Figura 5-5 Avaliação do emprego de surfactantes no processo de extração de proteínas

Após a realização dos experimentos esperava-se que os resultados na CMC e acima fossem semelhantes visto que a partir da CMC ocorre a formação de micelas no sistema. Contudo como pode ser observado, apenas para o surfactante Triton X-100 (barras vermelhas), apresenta comportamentos semelhantes na CMC e acima dela. Quanto ao Dodecilsulfato de sódio (barras azuis), os resultados indicaram extrações bastante semelhantes, abaixo da CMC e na CMC, sendo que na segunda condição foram observados os resultados mais representativos desse experimento (34,5%). Quando a CMC é ultrapassada a concentração de proteínas extraídas diminui bruscamente. O CTABr foi o surfactante que apresentou piores resultados dentre todos, sendo que a melhor condição foi abaixo da CMC. Estes comportamentos apresentados para o SDS e CTABr podem indicar diferenças nas CMC encontradas na literatura e a experimental devido à variações de temperatura ambiente, já que os valores utilizados nesse trabalho não foram determinados experimentalmente. Desta forma, há a possibilidade dos valores considerados CMC não serem os mesmos nessas condições em que os experimentos foram desenvolvidos, o que poderia explicar o comportamento do SDS.

Apesar de o surfactante SDS ter apresentado melhores resultados para a extração, a solução resultante apresentou a formação de suspensão, ainda possivelmente devido ao alto teor de lipídeos presente na amostra, o que impossibilita a utilização em análises cromatográficas. Em função disso, foi realizada

uma pré-extração da fase lipídica e nesta amostra livre de gordura foi avaliada a melhor condição encontrada até o momento (Tampão fosfato (1,00 mmol L^{-1}, pH 7,00), tempo 15 min, temperatura ambiente e uma etapa de centrifugação à 3000 rpm por 10 minutos + SDS (8 mmol L^{-1}), volume final da solução de 15 mL).

5.1.4 Pré-fracionamento da amostra

Nesta etapa foi avaliada além da amostra de rim uma amostra de contra-filé bovino. A fase lipídica foi extraída conforme descrito no item 4.7. Os resultados obtidos mostraram uma recuperação de 40 ± 3% para as amostras de rim. Esses resultados não mostraram grande diferença em relação à análise anterior, sem a etapa de pré-fracionamento. Isso evidencia que a adição desta etapa não influi na eficiência de extração. Entretanto, o extrato fica inteiramente homogêneo, sem a formação de emulsão, facilitando a completa separação da fase aquosa do resíduo da amostra sólida por centrifugação, o que possibilita posteriores análises cromatográficas, quando necessárias. As amostras de contra-filé apresentaram resultados de proteína extraída muito superiores aos obtidos pela amostra de rim (65 ± 6%). Em virtude dos melhores resultados obtidos pela amostra de contra-filé, optou-se por continuar o estudo com essa amostra.

Por fim, foram realizados experimentos avaliando-se diferentes valores pH da solução tampão.

5.1.5 Variação do pH

Park e Bean (2003) concluíram que o melhor meio para extração de proteínas em amostra de sorgo foi tampão alcalino e surfactante aniônico (SDS). Em virtude disso foi realizado um último experimentos alterando-se o pH da solução extratora tampões com pH 8, 9 e 10 foram avaliados. As condições utilizadas foram as mesmas sumarizadas no final do item 5.1.3 e a amostra de contra-filé foi utilizada livre de fase lipídica. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 5-6.

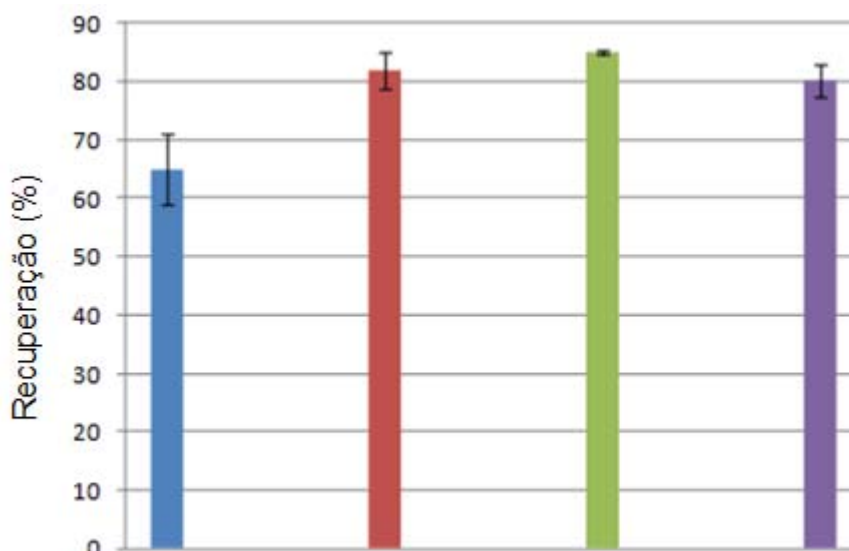



Figura 5-6 Efeito do pH do tampão fosfato sobre processo de extração de proteínas. Azul (pH 7), vermelho (pH 8), verde (pH 9), roxo (pH 10)

Como pode ser observado na figura 5-6, houve uma grande melhora na extração de proteínas com soluções alcalinas com valores ao redor de 85% de recuperação quando comparado com Kjeldahl. Comparando-se os pHs 8, 9 e 10 por meio do teste *t* para comparação de médias ao nível de 95 % de confiança, não houve diferença significativa entre as análises.

Nascimento e colaboradores (2010), fizeram extração de proteínas em amostras de castanhas livres de gordura, utilizando solução de NaOH (1 mol L^{-1}) com posterior precipitação com solução de HCl até pH~4, separação e ressolubilização em tampão tris-HCl (pH 7,5). Utilizando esse método de extração, apresentaram uma recuperação de 12% quando comparado com o valor total de proteína presente na amostra determinado por análise elementar CHNS.

Sun *et. al.* (1999), propuseram um método de extração de proteínas em gérmen de trigo livre de gordura por meio de um sistema de micela reversa, formado por bis (2 etil hexil) sulfosuccinato de sódio, iso-octano e solução de KCl. Micelas reversas são formações espontâneas e reversíveis de agregados esféricos de moléculas anfifílicas em solução apolar. Na presença de água, solubilizada, o centros polares presentes nesses agregados são capazes de solubilizar enzimas e outras substâncias. Utilizando a metodologia direta (forward), onde a proteína é solubilizada no centro das micelas reversas, foi obtida uma recuperação de 37% comparado com o teor total na amostra. Sun *et. al.* (2008) utilizaram a metodologia

indireta (backward), onde utiliza-se a fração residual da solução contendo as micelas, os autores obtiveram uma recuperação de aproximadamente 80%.

Pickardt *et. al.* (2009), otimizaram método de extração para amostras de farelo de girassol com soluções levemente ácidas (pH 6) e alta concentração salina e obtiveram recuperações de 76 - 83% de recuperação.

Comparando com os recentes trabalhos apresentados na literatura, o método proposto mostra-se, simples, brando e eficiente. Resumindo, o método otimizado neste trabalho para extração de proteínas em amostra de carne bovina foi agitação de 0,1 g de amostra livre de gordura por 15 min com tampão fosfato 1,00 mmol L^{-1} (pH 8) + SDS (8 mmol L^{-1}), volume final da solução de 15 mL, temperatura ambiente e uma etapa de centrifugação à 3000 rpm por 10 min. Nesta etapa não foram obtidos os perfis proteicos.

Após otimizada a extração, iniciou-se a calibração da coluna cromatográfica e otimização dos parâmetros eletroforéticos de análise.

5.2 Métodos de separação

5.2.1 Calibração da coluna cromatográfica

O sistema cromatográfica esta descrito no item 4.5.1. Inicialmente foi utilizado o detector espectrofotométrico monitorando-se o comprimento de onde de 290 nm. O primeiro passo para a calibração da coluna cromatográfica foi a determinação do volume morto da coluna. Para isso foi injetado na coluna um padrão de Blue Dextran de massa molar de 2000 kDa. Como esse padrão tem massa muito elevada, é completamente excluído da coluna, e por isso sai no seu tempo de retenção mínimo. Através desse valor mínimo de tempo de retenção é possível calcular o volume morto da coluna. A figura 5-7 traz o cromatograma obtido para o Blue Dextran. A partir da vazão do eluente (0,6 mL min^{-1}) e do tempo deste padrão é possível calcular o volume morto da coluna.

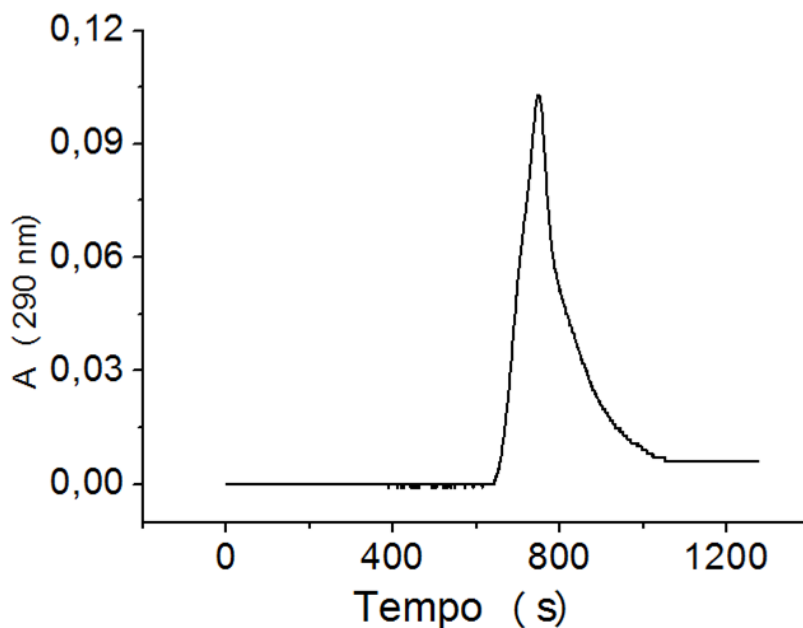



Figura 5-7 Cromatograma com detecção espectrofotométrica para padrão de Blue Dextran.

Como pode ser observado na figura 5-7, o tempo de retenção mínimo da coluna é de aproximadamente 780 s, portanto o volume morto da coluna levando-se em consideração a vazão de 0,6 ml min^{-1} é de 7,8 mL. Essa informação é importante, pois traz a faixa de separação da coluna, ou seja, todos os compostos fora da faixa de análise da coluna que possuem uma menor ou nenhuma interação com ela sairão neste tempo mínimo de análise de 780 s não havendo separação cromatográfica entre esses compostos.

Após a determinação do volume morto da coluna foram injetados três padrões de diferentes tamanhos na coluna. Os padrões utilizados foram ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e cianocobalamina (1,4 kDa). As injeções foram feitas separadamente e em duplicata. O cromatograma de cada padrão e do blue Dextran foram plotados juntos e estão apresentados na figura 5-8

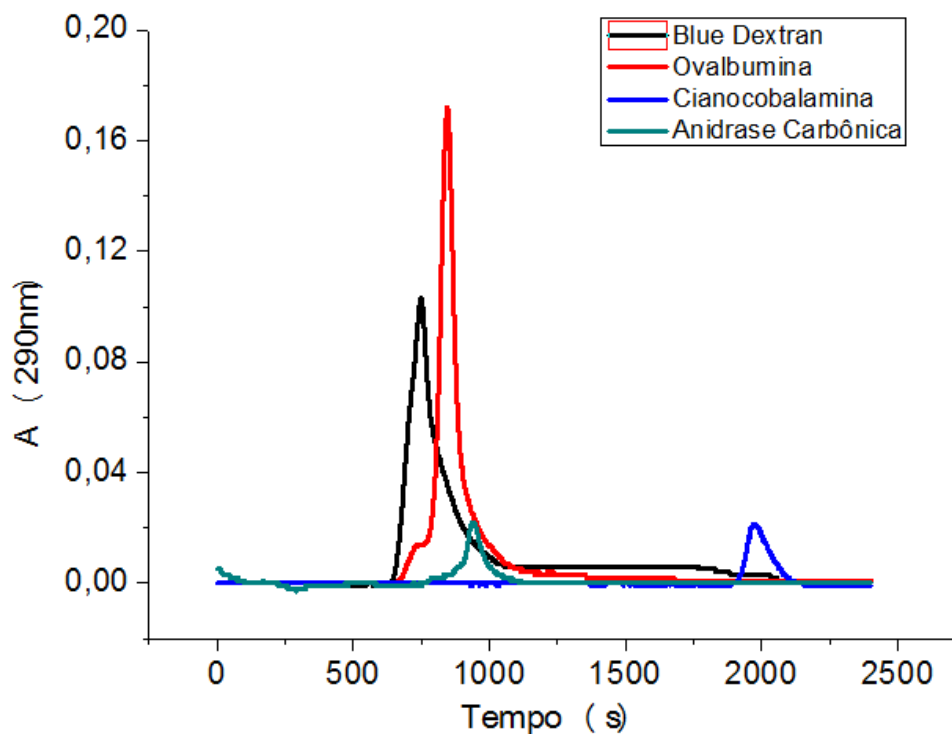



Figura 5-8 Cromatograma com detecção espectrofotométrica para calibração da coluna.

De posse dos tempos de retenção de cada padrão foi obtida uma curva de calibração para a coluna gerando-se o logaritmo da massa molar em função do tempo de retenção de cada padrão. A curva obtida juntamente com sua equação da reta e o coeficiente de correlação linear estão apresentados na figura 5-9.

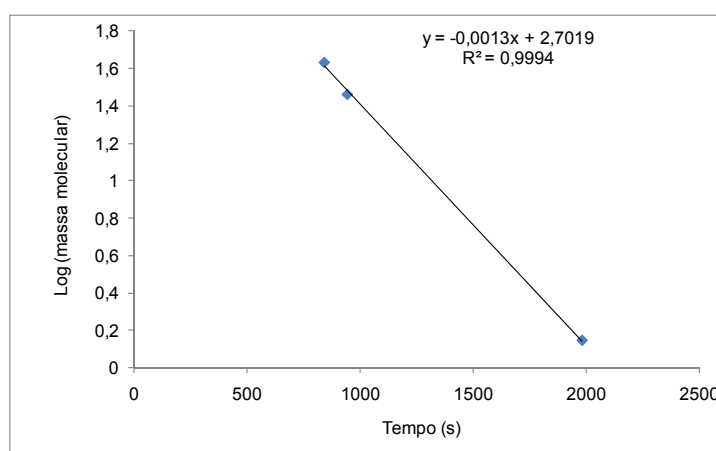



Figura 5-9 Curva de calibração da coluna de exclusão por tamanho utilizando os padrões Ovalbumina (43 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa) e Cianocobalamina (1,4 kDa)

Comparando-se os valores do coeficiente angular da reta obtida (-0,0013) com valores da literatura, observa-se uma boa concordância com os trabalhos de Vieira (2007) (-0,0025) e Harrington *et. al.* (2001) (-0,0056). Um aspecto importante nesta etapa foi a determinação da faixa de separação por SEC. Como o padrão de ovalbumina teve um tempo de retenção muito próximo ao do tempo de retenção mínimo da coluna, admitiu-se que a faixa de trabalho confiável para seqüência do trabalho seria de 1,4 - 43 kDa.

5.3 Métodos de Detecção

Os resultados para escolha dos parâmetros da detecção serão apresentados para cada elemento a ser estudado. Para a escolha foi aplicada a extração otimizada em uma amostra de contra-filé comercial e o extrato foi injetado no sistema cromatográfico descrito no item 4.5.2.

5.3.1 Cálcio

O cálcio foi o único elemento que apresentou sinal quando o ICP OES foi utilizado como detector. Não foi possível sua determinação com a utilização de nenhum dos isótopos utilizando o ICP-MS nas condições padrão do equipamento (tabela 4.1) devido às grandes interferências provindas de Ar. A utilização de CRI não se mostrou uma alternativa viável também devido à elevada perda de sinal dos analitos. Contudo com as condições de “cool” plasma foi possível a sua detecção. As duas condições de “cool” plasma foram adaptadas de uma nota técnica da Varian (Georgetis *et. al.*, 2009). Na nota, a primeira condição (tabela 4.3) foi descrita para análise de Ca e a segunda para análise de Fe. Observa-se que a primeira condição, mesmo o isótopo ^{42}Ca que é menos abundante pode ser detectado no ICP-MS, entretanto na condição 2 só foi possível detectar o ^{40}Ca, que é o mais abundante. Isso pode ser explicado pelo fato de que a condição 2 utiliza uma menor potência de radio-frequência, gerando um plasma menos energético, e uma maior vazão de nebulização, diminuindo o tempo de residência do analito na zona mais energética do plasma, isso faz com que a concentração do analito na forma iônica diminua e, por conseqüência, provoque perda de sensibilidade. Como o isótopo ^{42}Ca é o menos abundante não há sensibilidade para monitorá-lo na condição de “cool plasma” 2. Os cromatogramas obtidos em cada uma das condições são apresentados na figura 5-

10. É possível observar na figura que o elemento na amostra esta ligado à compostos acima da faixa de calibração da coluna, ou seja, esta acima de 43 kDa.

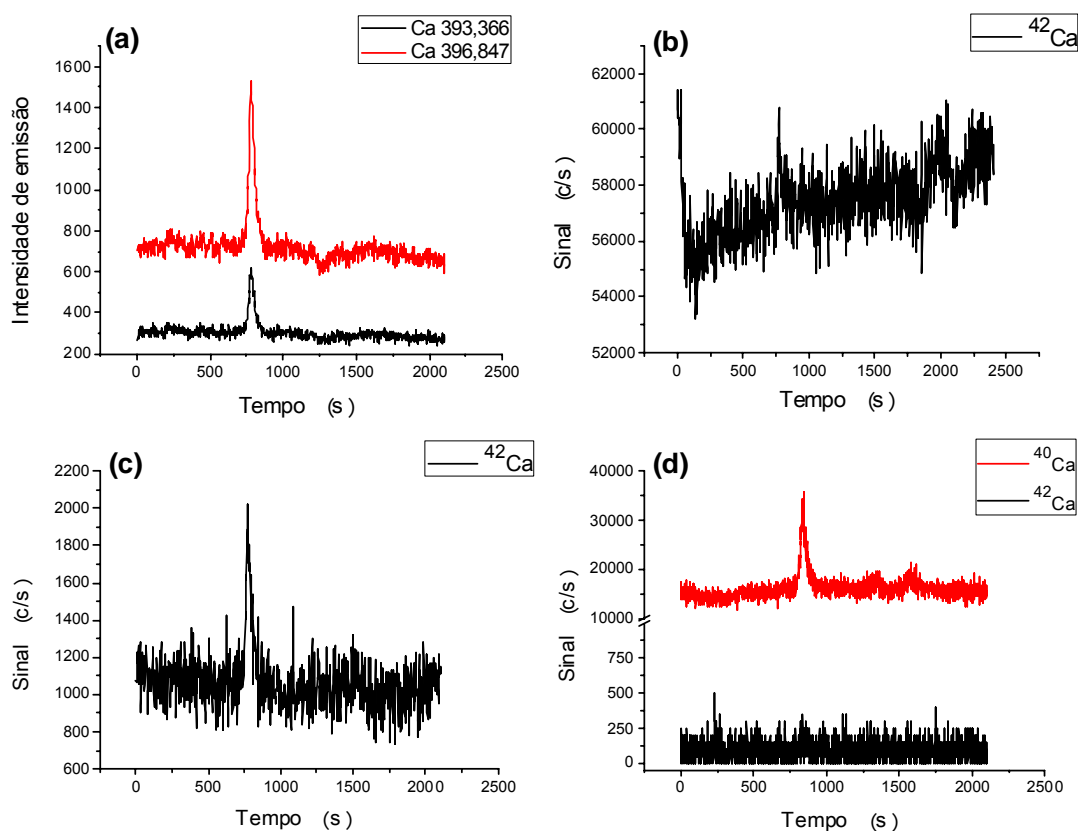



Figura 5-10 Resultados obtidos para Ca utilizando SEC em uma amostra de contra-filé de bovinos: (a) ICP OES, (b) ICP-MS condição padrão, (c) ICP-MS "cool" plasma condição 1, (d) ICP-MS "cool" plasma condição 2

5.3.2 Ferro

O ferro também sofre interferência de moléculas poliatômicas de Ar. O isótopo mais abundante do ^{56}Fe sofre interferência de $^{40}Ar^{16}O$, que são os isótopos mais abundantes de Ar e O, presentes copiosamente no plasma. Em virtude disso, o "cool" plasma também é uma alternativa bastante atrativa para a determinação de Fe. A figura 5-11 mostra os cromatogramas obtidos para o ^{56}Fe. É possível observar que utilizando as duas condições de cool plasma foi possível determinar o Fe, sendo que a condição 2 tem uma linha de base menor portanto, uma maior eficiência na retirada de interferentes, contudo uma menor sensibilidade também, tudo isso em virtude das mesmas características do plasma discutidas no item anterior. Com a alta interferência das moléculas poliatômicas de Ar provenientes do plasma

(condição padrão) resultou em uma elevada linha de base e com isso na perda de 2 possíveis picos cromatográficos presentes no tempo de 910 e 1170s, mostrando apenas o pico mais abundante que sai no tempo de residência mínimo da coluna. A baixa sensibilidade impossibilitou a detecção de Fe por ICP OES.

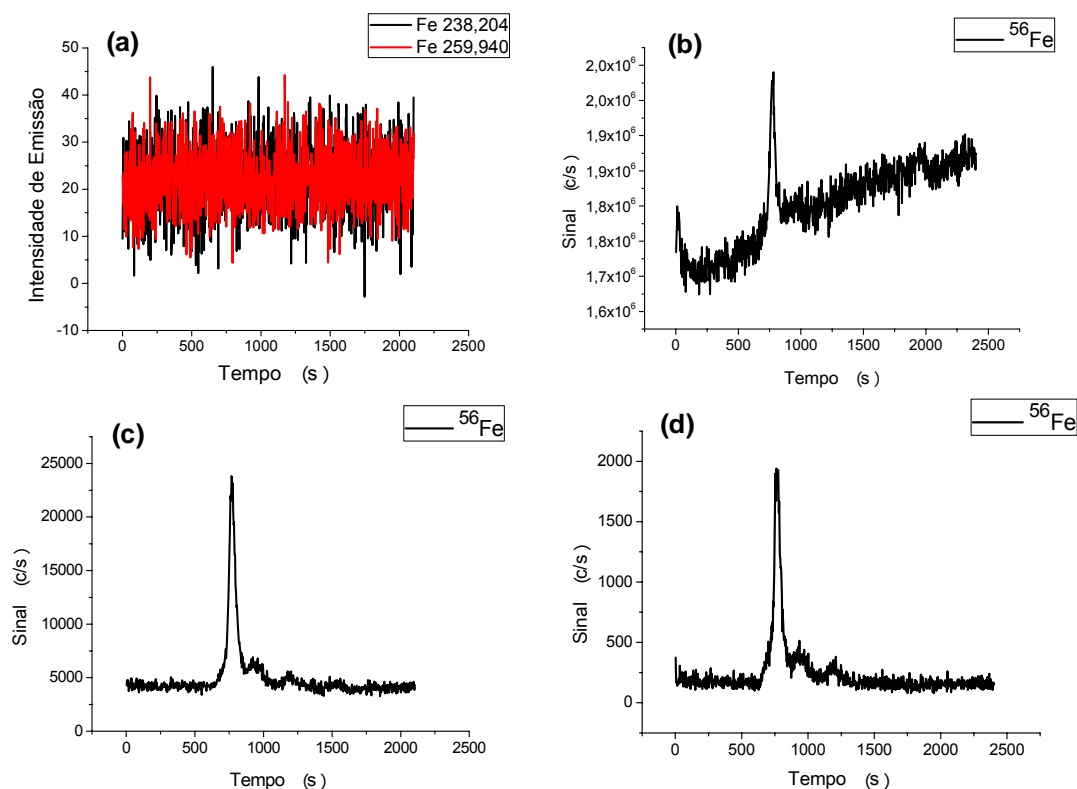



Figura 5-11 Resultados obtidos para Fe utilizando SEC em uma amostra de contra-filé de bovinos: (a) ICP OES, (b) ICP-MS condição padrão, (c) ICP-MS "cool" plasma condição 1, (d) ICP-MS "cool" plasma condição 2.

5.3.3 Cobre

Apesar de o cobre ser o mineral estudado que se encontrava em menor concentração na carne de bovinos (1 - 5 mg kg^{-1}) (Matos *et. al.*, 2009) , foi possível detectá-lo em todos os modos de análise por ICP-MS. No modo normal de determinação (b) há uma saliência por volta de 1750 s, podendo ser um pico. Todavia, devido a um deslocamento da linha de base fica impossível de se ter certeza. Não há muita diferença nas duas condições de cool plasma. No ICP OES não se obteve sinal devido à baixa sensibilidade. Os resultados apresentados para o Cu estão na figura 5-12 para o isótopo mais abundante ^{63}Cu.

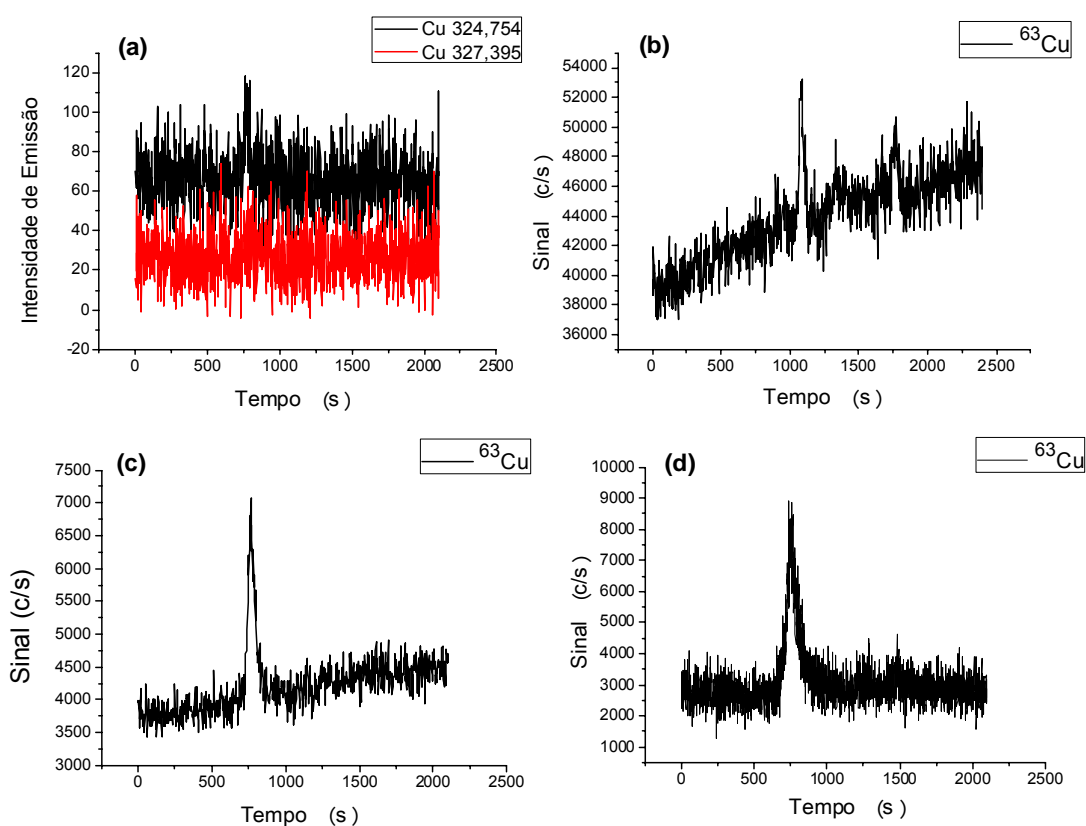



Figura 5-12 Resultados obtidos para Cu utilizando SEC em uma amostra de contra-filé de bovinos: (a) ICP OES, (b) ICP-MS condição padrão, (c) ICP-MS “cool” plasma condição 1, (d) ICP-MS “cool” plasma condição 2

5.3.4 Zinco

Por fim, o zinco foi o elemento que mostrou os melhores resultados. Assim como o cobre, pôde-se detectá-lo em todas as condições utilizadas no ICP-MS, a condição normal de operação mostrou resultados muito bons e picos muito definidos. Apesar da perda de sensibilidade nos modos de “cool” plasma, ainda sim os picos obtidos foram muito bem definidos e separados. Novamente, entretanto, não foi possível a utilização do ICP OES devido à baixa sensibilidade. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 5-13.

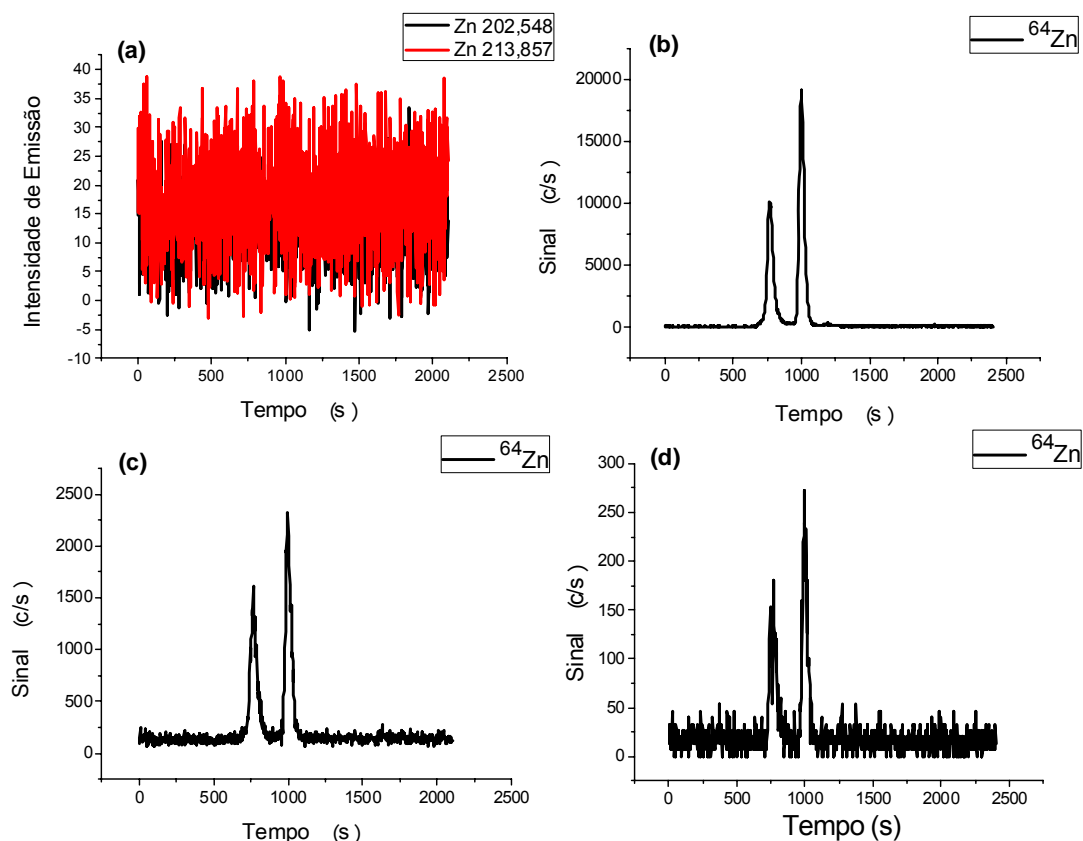



Figura 5-13 Resultados obtidos para Cu utilizando SEC em uma amostra de contra-filé de bovinos: (a) ICP OES, (b) ICP-MS condições padrão, (c) ICP-MS e “cool” plasma condição 1, (d) ICP-MS e “cool” plasma condição 2.

5.3.5 Magnésio

O elemento Mg também foi avaliado nas mesmas condições descritas acima. Contudo não foi possível a sua determinação em nenhuma das condições. Provavelmente este elemento não esteja ligado ou esteja ligado em concentrações muito baixas à fração protéica da carne, apesar da sua elevada concentração nessa matriz.

5.3.6 Condição de compromisso

Como pôde ser observado, O ICP OES só permite a determinação de Ca. A condição padrão do plasma, apesar de muito boa para o zinco, apresenta severa variação de linha base para Fe e Cu, o que provoca a perda de picos menos intensos e a linha de base é tão intensa para o Ca que não houve possibilidade de detecção nesta condição. As duas condições de “cool” plasma possibilitaram a

detecção de todos os elementos de interesse, apesar de a condição 1 apresentar melhores intensidades de picos, para quase todos os elementos, a condição 2 apresenta menor linha de base, todavia essas características devem ser consideradas com cuidado pois as condições do equipamento podem mudar severamente em dias diferentes. Na continuação do trabalho são apresentados os resultados obtidos com a condição 2.

5.4 Análises de amostras com diferentes períodos de maturação

Nesta etapa do trabalho foi feita a aplicação do procedimento desenvolvido para amostras de tecido bovino com diferentes períodos de maturação. Para isso foram utilizadas duas amostras, amostra 1 com três períodos diferentes de maturação (0, 7 e 14 dias) e amostra 2 com dois períodos (0 e 7 dias). Esse estudo foi realizado de modo que a maturação fosse a única variável nas amostras, ou seja, as amostras eram provenientes da mesma região, os animais eram da mesma raça (Wagyu) e o corte utilizado foi o mesmo (contra-filé). As amostras, assim como os resultados de força de cisalhamento foram fornecidas pelo laboratório de carne da Embrapa Pecuária Sudeste. Na tabela 5-3 é apresentada a força de cisalhamento e os teores de proteínas totais para cada uma das amostras em cada período. A força de cisalhamento é uma medida inversamente proporcional à maciez, portanto é possível observar que as amostras a partir de 7 dias de maturação apresentam uma aumento substancial de maciez, o teor de proteína total, por outro lado, não se alterou no período.

Tabela 5-3 Força de cisalhamento e teor de proteínas nas amostras estudadas

Amostra	Força de cisalhamento (kgf cm^{-2})	Proteína total (%)
1 – 0 dias	5,84	85,2 $\pm$ 0,5
1 – 7 dias	2,55	85,4 $\pm$ 0,4
1 – 14 dias	2,23	88,9 $\pm$ 1,8
2 – 0 dias	8,30	85,4 $\pm$ 0,4
2 – 7 dias	3,16	84,7 $\pm$ 0,6

As amostras foram preparadas conforme pré-estabelecido no capítulo 5.1. Análises de SDS-PAGE e HPLC-ICP-MS foram realizadas com os extratos. O procedimento de SDS-PAGE esta descrito no item (4.8). O sistema cromatográfico utilizado foi apresentado no tem (4.5.2). As condições do ICP-MS utilizadas foram as de “cool” plasma 2.

5.4.1 SDS-PAGE

Antes de realizar as análises por HPLC-ICP-MS foi feita uma análise exploratória por SDS-PAGE. A elevada diluição final da amostra (extração + análise eletroforética + digestão das bandas) impossibilitou a detecção dos minerais nesta etapa mesmo por ICP-MS. Por isso, neste capítulo será apresentado apenas o gel obtido nas análises eletroforéticas. Esta análise foi realizada em duplicata, e foi obtida uma boa concordância entre as replicatas.

Dezessete bandas foram numeradas no gel. A figura 5-14 mostra a foto do gel de eletroforese e na tabela 5-4 estão listados os tamanhos estimados para cada banda. Os produtos de degradação de cerca de 28 - 30 kDa provenientes da troponina T parecem estar presentes. Em todas as amostras, há diversas bandas protéicas nesta faixa como pode ser observado. Outro produto de degradação que cai numa faixa rica em bandas eletroforéticas é o polipeptídeo de 38 kDA proveniente da dismina. Pode ser observada ainda uma banda com tamanho estimado de 17 kDa, possivelmente a mioglobina.

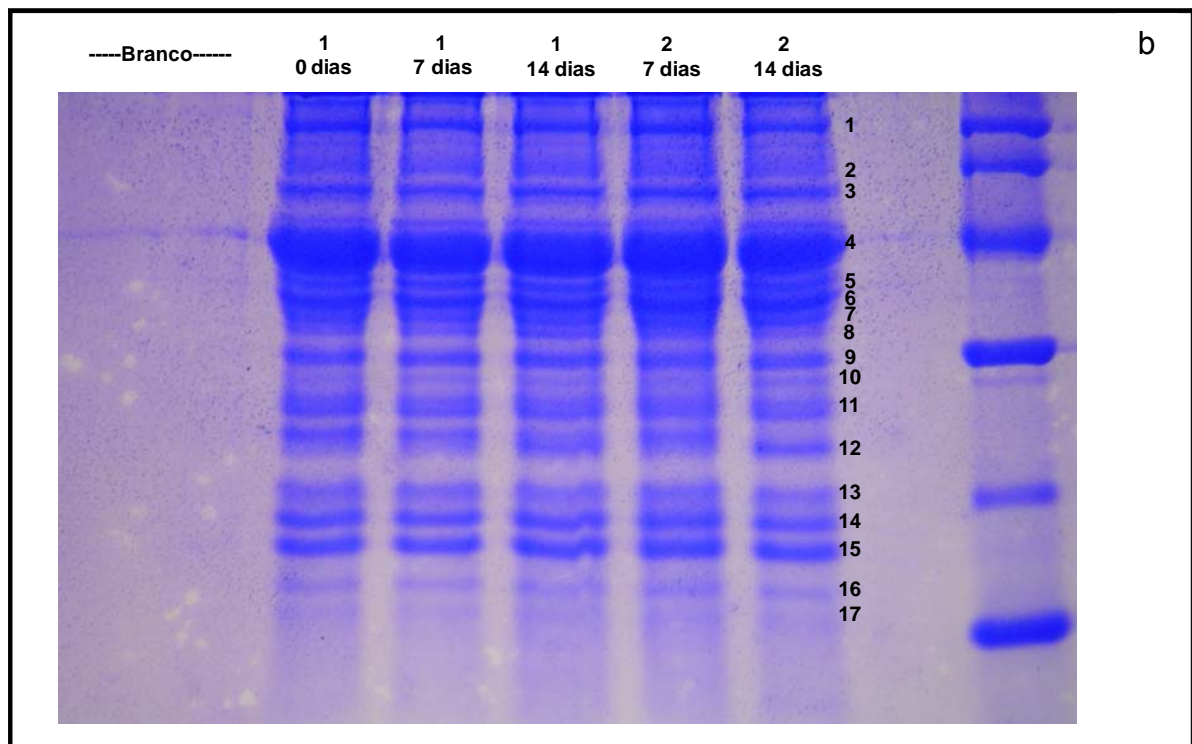
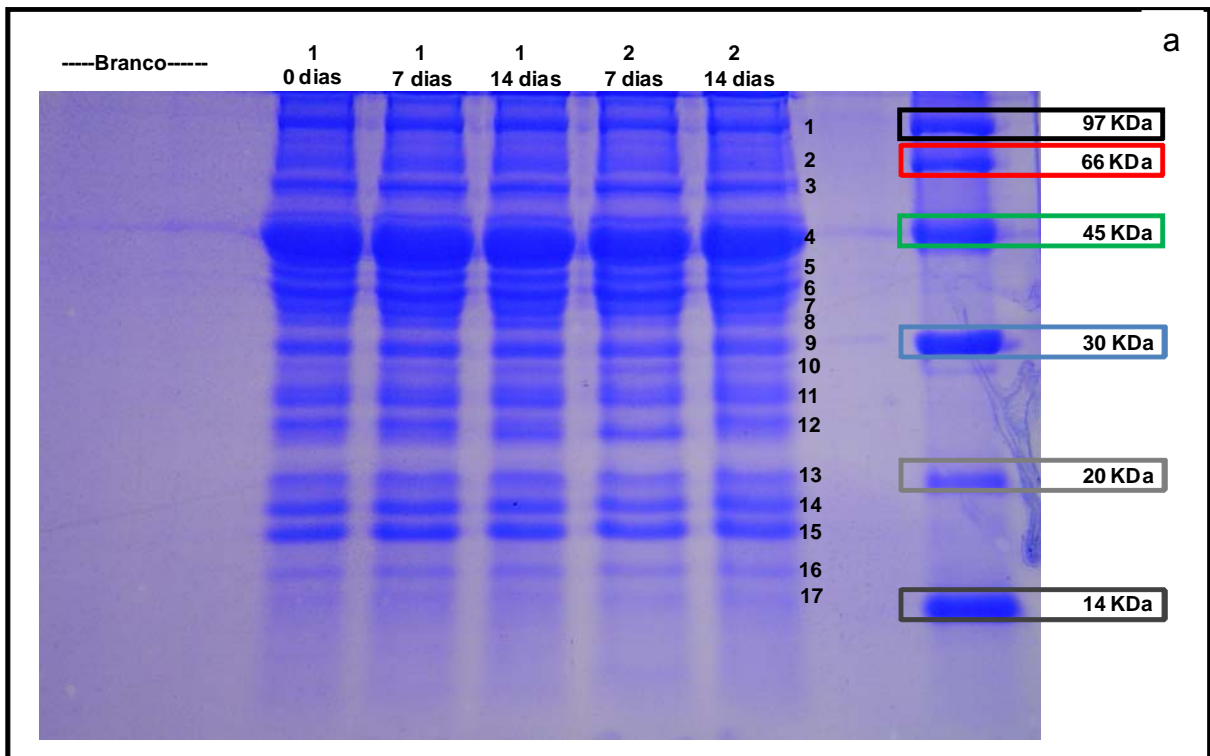



Figura 5-14 (a) Foto do gel com a análise das amostras e curva de calibração, revelado com Coomassie Blue. (b) replicata

Tabela 5-4 Proteínas encontrada nas amostras de carne

Banda	Tamanho estimado (kDa)
1	97
2	64
3	59
4	47
5	41
6	40
7	37
8	35
9	32
10	30
11	27
12	25
13	21
14	19
15	17
16	14,7
17	13,5

5.4.2 DETERMINAÇÃO DOS TEORES TOTAIS DOS ELEMENTOS

Após a caracterização do perfil protéico por eletroforese foram determinados os teores totais dos elementos de interesse utilizando-se ICP OES. Os valores encontrados estão apresentados na tabela 5-5

Tabela 5-5 Teores totais dos elementos de interesse em amostras com diferentes períodos de maturação

	Ca	Cu	Fe	Mg	Zn
			($mg\ kg^{-1}$)		
1 – 0 dias	185 ± 3	3,46 ± 0,02	72,1 ± 1,5	1260 ± 2	128 ± 4
1 – 7 dias	178 ± 5	2,65 ± 0,11	78,5 ± 0,6	1272 ± 35	125 ± 6
1 – 14 dias	177 ± 5	3,70 ± 0,21	81,4 ± 0,5	1204 ± 85	127 ± 6
2 – 0 dias	157 ± 1	2,36 ± 0,63	71,5 ± 1,3	1186 ± 41	112 ± 2
2 – 7 dias	319 ± 2	3,83 ± 0,18	69,3 ± 4,5	1159 ± 47	116 ± 4

Como pode ser observado os valores encontrados estão bastante condizentes com os encontrados por Matos e colaboradores (2008) apontados no item 3.6. As variações entre as amostras e os períodos de maturação são baixas para a maioria dos elementos, contudo a amostra 2 apresentou no período de 7 dias de maturação aproximadamente o dobro da concentração de Ca em relação a mesma amostra com 0 dias de maturação. Como é bastante documentado, a importância do Ca no mecanismo das calpaínas na etapa de maturação da carne, seria bastante coerente este resultado, contudo a amostra 1 não apresentou o mesmo comportamento, com isso faz-se necessário um número maior de experimento, com uma quantidade maior de amostras para tirar-se uma conclusão significativa.

5.4.3 SEC-HPLC-ICP-MS

Por último, análises cromatográficas foram realizadas. Os resultados estão separados para cada elemento analisado.

5.4.3.1 Cálcio

Os cromatogramas obtidos para o cálcio estão na figura 5.15. A maior parte do Ca ligado à fração protéica é eluído junto com o volume morto da coluna, portanto esta ligado às proteínas com massa igual ou maior a 43 kDa. É bem documentado na literatura que o cálcio se liga a moléculas de troponina no sistema contrátil (Martins, 2009). Segundo Sgarbieri (1996), as troponinas são compostas por três subunidades, troponina C (TnC) , troponina I (TnI) e troponina T (TnT) e tem

massa molar de 72 kDa, sendo que a TnC é o principal sítio ligante do Ca^{2+}. Como já apontado no capítulo 3.5 o resíduo de TnT de aproximadamente 28 - 30 kDa, possivelmente bandas 10 ou 11 na corrida eletroforética, é um dos produtos de degradação que aparecem nas mudanças proteolíticas e que esta fortemente relacionado com a força de cisalhamento da carne. Levando isso em consideração, a massa molar da troponina resultante, TnC + TnI, somaria aproximadamente 42 - 44 kDa, podendo corresponder às bandas 4 ou 5 da corrida eletroforética e ainda bastante concordante com os resultados obtidos na análise cromatográfica. Isso poderia ser um forte indício de que o Ca^{2+} ligado à proteína nas amostras estudadas tenha o tamanho de aproximadamente 43 kDa. Quanto ao perfil dos diferentes períodos de maturação, assim como as análises eletroforéticas, os perfis de metaloproteínas de Ca não apresentaram diferença.

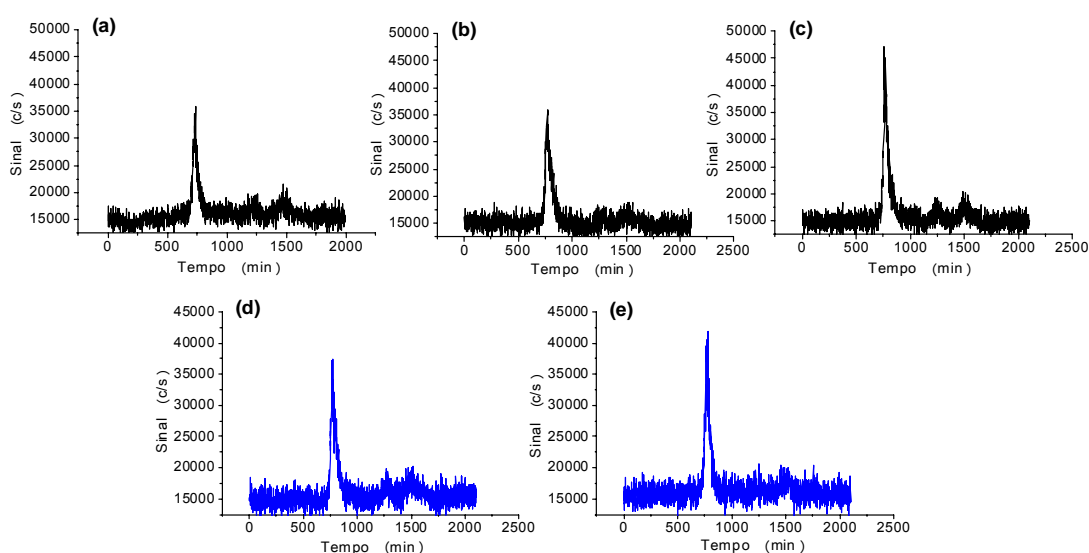



Figura 5-15 Resultados obtidos para ^{40}Ca utilizando SEC-ICP-MS: (a) amostra 1-0 dias de maturação, (b) amostra 1-7 dias de maturação, (c) amostra 1-14 dias de maturação, (d) amostra 2-0 dias de maturação (e) amostra 2-7 dias de maturação.

5.4.3.2 Ferro

Os cromatogramas obtidos para o Ferro estão na figura 5-16. Assim como o Ca, a maior parte do Fe da fração protéica é eluído junto com o volume morto da coluna, portanto esta ligado às proteínas com massa maior ou igual a 43 kDa. Contudo há um pico menos intenso porém ainda bem definido no tempo de 1150 s, correspondente à fração de tamanho de 17 kDa, correspondente à banda 15 da corrida eletroforética. Esse pico já era esperado visto que parte do ferro encontrado

no sistema contrátil está ligado à proteína sarcoplasmática mioglobina, de massa molar de aproximadamente 17,5 kDa. Essa proteína tem 153 resíduos de aminoácidos, formada de globina e de um radical heme que se liga ao Fe, sendo que o Fe ligado ao radical heme é muito absorvível pelo corpo humano. Uma possibilidade para o pico de maior massa seria que esse ferro estivesse presente ligado à hemoglobina (66,5 kDa). A hemoglobina tem uma massa molar de cerca de 66,5 kDa, formado por quatro subunidades cada qual ligada a um grupo porfirinico com um átomo de Fe próximo do centro (Smith, 1990). Essa hipótese pode ser sustentada pela fração de 66,5 kDa presente na análise eletroforética. Além disso, diferenças de magnitude de sinal foram observadas, sobretudo na amostra 2 onde houve uma redução acentuada de aproximadamente 1/3 do sinal do pico de maior massa. Uma possível explicação para isso seria variação na quantidade de sangue presente nas amostras intramuscular ou devido à diferença na lavagem. Essa informação pode ser outra evidência de que este pico seja proveniente da hemoglobina. Quanto ao perfil ferro-protéico em diferentes tempos de maturação, não houve diferenças sistemáticas entre as amostras.

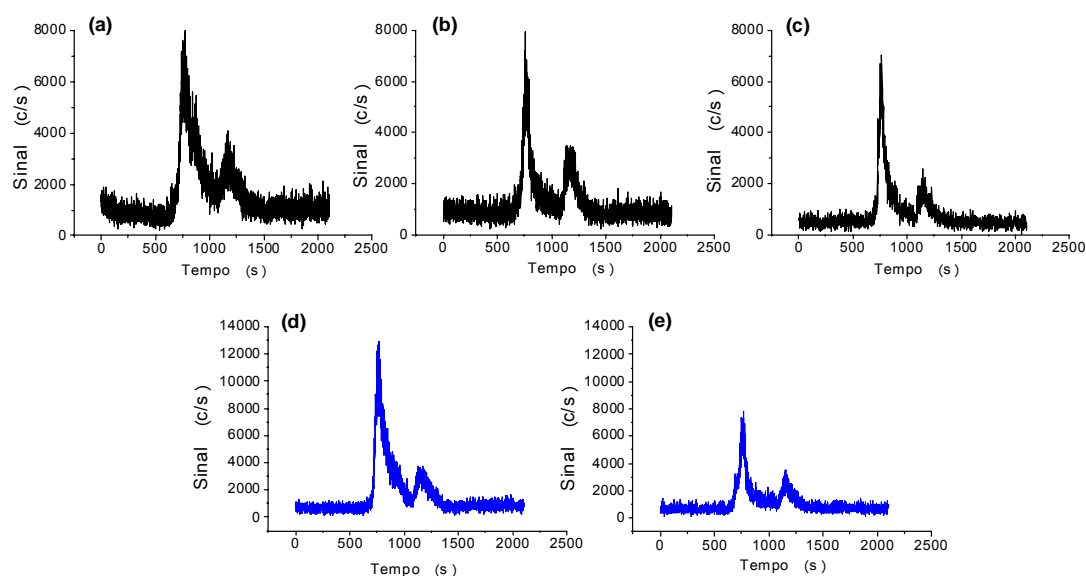



Figura 5-16 Resultados obtidos para ^{56}Fe utilizando SEC-ICP-MS: (a) amostra 1-0 dias de maturação, (b) amostra 1-7 dias de maturação, (c) amostra 1-14 dias de maturação, (d) amostra 2-0 dias de maturação (e) amostra 2-7 dias de maturação.

5.4.3.3 Cobre

Também o cobre esta ligado completamente à fração de 43 kDa ou maior (figura 5-17). Quase nenhuma diferença pode ser notada entre os diferentes períodos de maturação de cada amostra. Gomez - Ariza e colaboradores (2006), estudando perfil de metaloproteínas em amostras de castanha de diversas localidades da Espanha encontraram em apenas uma amostra proveniente de Cádiz cobre ligado à uma fração acima da faixa mencionada neste trabalho, o Cu estava ligado à fração de 70 kDa. Naozuka *et. al.* (2010), estudaram o perfil de Cu solúvel em água em amostras de castanha do Pará, semente de copuassú e polpa de coco. Pelos cromatogramas apresentados no trabalho foi possível observar um único pico de Cu acima de 43 kDa em amostras de polpa de coco e castanha do Pará, sendo esta fração correspondente a 60 kDa. Szpunar e colaboradores (1999) descrevem a albumina (64,5 kDa) como umas das proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo e devido à essa abundância e pequeno tamanho uma grande gama de metais como Ca, Cu e Zn são transportados por ela. Em vista disso, e como há uma banda protéica estimada nas análises eletroforéticas em 64 kDa, é possível que parte dessa banda seja relativa à albumina e parte do cobre presente nessa amostra esteja ligado à ela. Contudo para essa hipótese ser plausível haveria uma sobreposição entre as bandas 64 e 66,5 kDa referentes à hemoglobina e albumina (Gómez-Ariza *et. al.*, 2006).

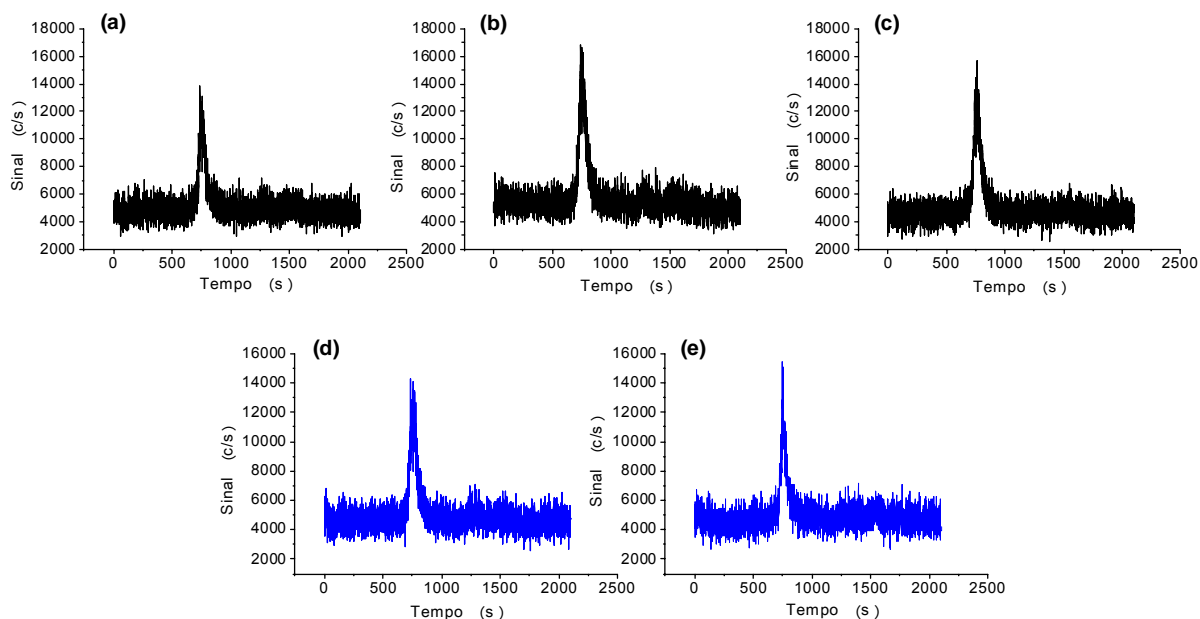



Figura 5-17 Resultados obtidos para ^{63}Cu utilizando SEC-ICP-MS: (a) amostra 1-0 dias de maturação, (b) amostra 1-7 dias de maturação, (c) amostra 1-14 dias de maturação, (d) amostra 2-0 dias de maturação (e) amostra 2-7 dias de maturação.

5.4.3.4 Zinco

Por fim, os resultados referentes ao perfil de Zn estão apresentados na figura 5-18. O Zn, assim como o Fe foi separado em duas frações distintas, a primeira elui juntamente com o volume morto da coluna, ou seja, assim como para todos os outros elementos há uma fração de Zn ligada às proteínas de 43 kDa ou maiores. A hipótese descrita para o Cu sobre a albumina poderia ser extrapolada para o Zn, então essa banda de menor intensidade poderia ser o Zn ligado à albumina (64 kDa). O segundo pico, em geral de maior intensidade esta ligado à uma fração de tamanho estimado de 27 kDa. Essa fração pode ser confirmada por eletroforese em gel (banda 11). Alguns trabalhos fazem fracionamento de Zn em diferentes amostras. Naozuka e colaboradores (2010) mostraram que para as amostras de castanhas do Pará, polpa de coco e semente de copuassú o zinco esta presente ligado às frações de baixa massa molar, em geral abaixo de 10 kDa. A única fração identificada acima dessa massa foi 16 kDa em amostras de polpa de coco, mostrando como já era esperado um comportamento muito diferente entre as metaloproteínas vegetais e animais. Bossu (2009), em diferentes tipos de leite, bovino, soja, cabra e ovelha, encontrou o zinco ligado a diferentes bandas protéicas, variando de 24 kDa para leite bovino UHT e leite de ovelha, até 32 kDa para leite bovino in natura e UHT, ovelha e cabra e 39 kDa apenas para leite de soja. Santos e

colaboradores (2011) encontraram Zn ligado à 6 frações proteicas em amostra de plasma de tilápia do Nilo sendo duas delas com tamanhos parecidos à primeira fração encontrada neste trabalho (24,8 e 31,5 kDa) e quatro frações com tamanho acima de 43 kDa sendo uma delas de tamanho 64,4 kDa e pI 4,9 correspondente à albumina, condizente com o que foi proposto nesse trabalho. Quanto ao perfil das amostras de acordo com o período de maturação, não houve diferença entre as amostras, assim como nos outros elementos.

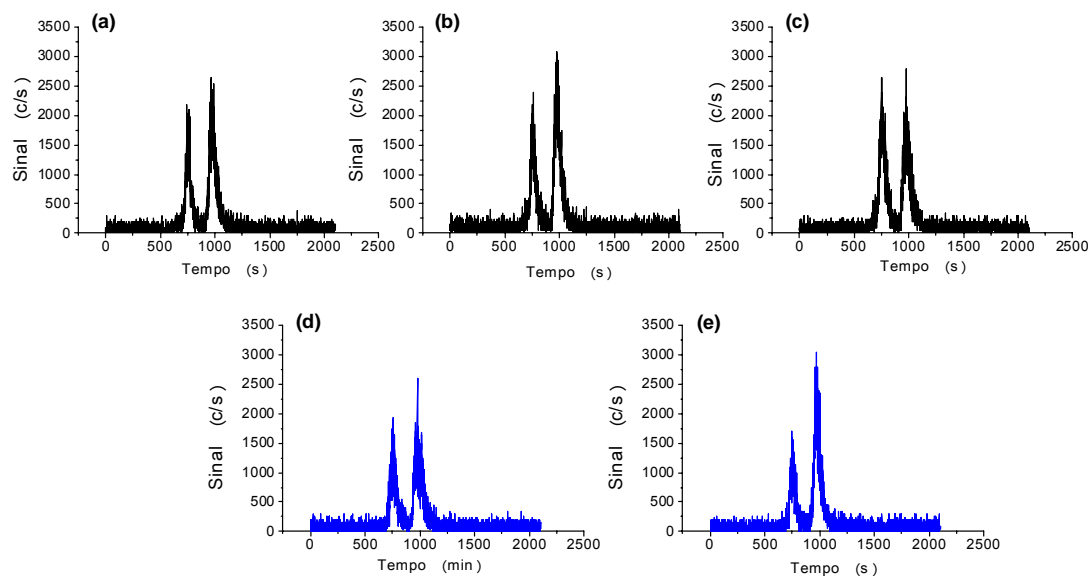



Figura 5-18 Resultados obtidos para ^{64}Zn utilizando SEC-ICP-MS: (a) amostra 1-0 dias de maturação, (b) amostra 1-7 dias de maturação, (c) amostra 1-14 dias de maturação, (d) amostra 2-0 dias de maturação (e) amostra 2-7 dias de maturação

Conclusões

6 Conclusões

De acordo com os resultados apresentados, o método proposto é eficiente para extração de proteínas, bastante simples, rápido e brando conforme a necessidade para esse tipo de análise. A utilização do ICP-MS para determinação simultânea de Ca, Cu, Fe e Zn foi possível apenas quando condições de “cool” plasma foram empregadas. O Mg também foi avaliado, contudo possivelmente devido à baixa concentração desse analito na fração protéica não foi detectado em nenhuma das condições avaliadas. Somente o Ca foi detectado quando o ICP OES foi utilizado como detector.

As amostras avaliadas com diferentes períodos de maturação não apresentaram nenhuma diferença mensurável na faixa de separação estudada tanto por SEC-ICP-MS quanto por SDS-PAGE. Devido à alta diluição final, não foi possível quantificar os minerais nas bandas eletroforéticas, por isso para essa técnica foram apresentados apenas os resultados quanto ao perfil protéico. Contudo as informações das duas análises foram uteis para confirmar e propor algumas hipóteses sobre o perfil de metaloproteínas.

O Fe e o Zn apresentam dois picos cromatográficos. A possibilidade levantada nesta tese, de acordo com os resultados encontrados e recorrendo à literatura é que o Fe estaria ligado na carne majoritariamente às duas proteínas mioglobina (17 kDa) e hemoglobina (64 kDa). O Zn estaria ligado à albumina (64 kDa) e a uma outra fração de 27 kDa. O Cu, assim como o Zn estaria ligado à albumina (64 kDa), enquanto o Ca estaria ligado à troponina de 43 kDa, proteína intimamente relacionada ao processo de maturação da carne. Todavia mais experimentos são necessários para provar essas hipóteses, visto que a maioria dos elementos apresentou picos fora da faixa de calibração estudada.

Referências

7 Referências

ANDRIGUETO, C.; JORGE, A. M.; ROÇA, R. O.; SARTORI, D. R.; RODRIGUES, E.; Bianchini, W. "Maturação de carne bovina". *Rev. Electr. Vet.*, **7** : 1, 2006

AROCKIASAMY, D. L.; RADHIKA, S.; PARTHASARATHI, R.; BALACHANDRAN, U. N. "Synthesis and DNA-binding studies of two ruthenium (II) complexes of na intercalating ligand". *Eur. J. Med. Chem.*, 44 : 2044, 2009

ARRUDA, M. A. Z. *Trends In Sample Preparation*. Nova York, Nova Science, 2007. p. 304

AZEVEDO, F. A. & CHASIN, A. A. *Metais – Gerenciamento Da Toxicidade*. São Paulo, Ateneu, 2003. p. 554

BARRA, C. M.; SANTELLI, R. E.; ABRÃO, J. J.; LA GUARDIA, M. "Especiação de arsênio – Uma revisão". *Quim. Nova,* **23** (1) : 58, 2000

BARCELLOS, M. D.; "Beef Lovers" Um Estudo Cross-Cultural Sobre o Comportamento de Consumo de Carne Bovina. Porto Alegre, Programa de pós graduação em agronegócios-UFRGS, 2007. Tese de doutorado, 328p.

BERG, T. & LARSEN, E. H.; "Speciation and legislation – Where are we today and what do we need for tomorrow". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **363** : 431, 1999

BEZARRA, M. A. & FERREIRA, S. L. C. *Extração em Ponto Nuvem: Princípios e Aplicações em Química Analítica*. Vitória da Conquista, UESB, 2006. p. 165

BRADFORD, M. M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" A*nal. Biochem.*, **72** : 248, 1976

BREIDENSTEIN, B. C. & CARPENTER, Z. L. "The red meat industry: Product and consumerism". *J. Anim. Sci.,* **57** : 119, 1983

BOSSU, C. M.; Fracionamento de Zinco em Amostras de Leite. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2009, Dissertação de mestrado, 89p.

BOVELL-BENJAMIN, A. C.; HATHORN, C. S.; IBRAHIM, S.; GICHUHI, P. N.; BROMFIELD, E. M. "Healthy food choices and physical activity opportunities in two contrasting Alabama cities". *Health & Place*, **15** : 429, 2009

COLLINS, H. C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia.* Campinas, Editora Unicamp, 2006. p. 453

CONN, E. E. & STUMPF, P. K. *Introdução a Bioquímica*. São Paulo, Edgard Blucher, 1980. p. 525

CRICHTON, R. R.; Biological Inorganic Chemistry – An Introduction. Oxford, Elsevier, 2008. p. 369

E-escola, Instituto Superior e Técnico; Electroforese e imunodetecção de proteínas; disponível em http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?id=246&ordem=2; Acesso 01/09/11.

EMABRAPA GADO DE CORTE; Noções de ciência de carne; disponível em http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc77/03nocoescarne.html#3.3.1; acesso 16/02/12

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. "The importance of trace elements speciation in nutritional sciences". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **363**: 536, 1999

FAIRWEATHER-TAIT, S. & HURRELL, R. F. "Bioavailability of minerals and trace elements". *Nutr. Res. Rev.,* **9** : 295, 1996

FIALHO, L. L.; PEREIRA, C. D.; NÓBREGA, J. A. "Combination of cool plasma and collision-reaction interface for correction of polyatomic interferences on copper signals in inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry". *Spectrochim. Acta Part B.,* **66** : 389, 2011

GARCIA, J. S.; MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. "Trends in metal-binding and metalloprotein analysis". *Talanta.,* **69** : 1, 2006

GEORGITIS, S.; ANDERSON, S.; PLANTZ, M.; NHAM, T. T. "Cool Plasma technique for the ultra-trace level determination of 56Fe, 40Ca, 39K, 7Li, 24Mg and 23Na for Semi-Conductor applications". *Varian Technical Note*, 2009

GOHEEN, S. C. & MATSON, R. S. "Determining the critical micelle concentration using a binary mixing system". *J. Am. Oil Chem. Soc.,* **66** : 994, 1989

GOMES, C. M. & WITTUNG-STAFSHEDE, P. Protein Folding and Metal Ions – Mechanism, Biology and Disease. EUA, CRC Press, 2011. p. 286

GÓMEZ-ARIZA, J. L.; ARIAS-BORREGO, A.; GARCÍA-BARRERA, T. "Multielemental fractionation in pine nuts (Pinus pinea) from different geographic origins by size-exclusion chromatography with UV and inductively coupled plasma mass spectrometry detection". *J. Chromatogr. A,* **1121** : 191, 2006

GÓMEZ-ARIZA, J. L.; GARCÍA-BARRERA, T.; LORENZO, F.; BERNAL, V.; VILLEGAS, M. J.; OLIVEIRA, V. "Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems". *Anal. Chim. Acta*, **524** : 15, 2004

GONÇALVES, A. M. Determinação e Fracionamento de Bário em Castanha-do-Pará. São Carlos, Programa de pós graduação em química - UFSCar, 2007. Dissertação de mestrado, 98p.

HARRINGTON, C. F.; ELAHI, S.; MERSON, S. A.; PONNAMPALAVANAR, P. "A method for the quantitative analysis of iron speciation in meat by using a combination of spectrophotometric methods and high-performance liquid chromatography coupled to sector field inductively coupled plasma mass spectrometry". *Anal. Chem.*, **73 :** 4422, 2001

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. São Paulo, INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2004. p. 1004

IRVING, H. & WILLIAMS, R. J. P. "The stability of transition-metal complexes". *J. Chem. Soc.* 3192, 1953

KANNAMKUMARATH, S. S.; WROBEL, K.; WROBEL, K.; VONDERHEIDE, A.; CARUSO, J. A. "HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut". *Anal. Bioanal. Chem.,* **373** : 454, 2002

LAWRIE, R. A. *Ciência da carne*. Porto Alegre, Artmed, 2005. p. 384

LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. São Paulo, Sarvier, 1984. p. 725

LONERGAN, E. H.; MITSUHASHI, T.; BEEKMAN, D. D.; PARRISH JR, F. C. OLSON, D. G.; ROBSON, R. M. "Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle". *J. Anim. Sci.,* **74** : 993, 1996

LONERGAN, E. H.; ZHANG, W.; LONERGAN, S. M. "Biochemistry of postmortem muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization". *Meat Sci.,* **86** : 184, 2010

LONNERDAL, B. "Bioavailability of copper". *Am. J. Clin. Nutr.,* **63** : 821S, 1996

MARTINO, F. A. R.; SÁNCHEZ, M. L. F.; SANZ MEDEL, A. "Multi-elemental fractionation in milk whey by size exclusion chromatography coupled on line to ICP-MS". *J. Anal. At. Spectrom.* **17** : 1271, 2002

MARTINS, C. S. "Troponina - Estrutura, Fisiopatologia e Importância Clínica para Além da Isquemia Miocárdica". *Arq. Med.,* **23** : 221, 2009

MATOS, W. O.; NOBREGA, J. A.; SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A. "Especiação redox de cromo em solo acidentalmente contaminado com solução". *Quím. Nova,* **31** : 1450, 2008

MATOS, W. O.; MENEZES, E. A.; GONZALEZ, M. H.; COSTA, L. M.; TREVIZAN, L. C.; NOGUEIRA, A. R. A. "Partial microwave-assisted wet digestion of animal tissue using a baby-bottle sterilizer for analyte determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry". *Spectrochim. Acta Part B.,* **64** : 615, 2009

MICHALKE, B. "The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects". *Trends Anal. Chem.,* **21** : 142, 2002

MONTASER, A. & GOLIGHTLY, D. W. *Inductively coupled plasmas on analytical atomic spectroscopy*. New York, VCH Publisher, 1992. p. 984

MOUNICOU, S & LOBINSKI, R. "Challenges to metallomics and analytical chemistry solutions". *Pure Appl. Chem.,* **80** : 2565, 2008

NAOZUKA, J.; MARANA, S. R.; OLIVEIRA, P. V. "Water-soluble Cu, Fe, Mn and Zn species in nuts and seeds". *J. Food Compos. Anal.,* **23** : 78, 2010

NASCIMENTO, A. N.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V. "In vitro evaluation of Cu and Fe bioavailability in cashew nuts by off-line coupled SEC–UV and SIMAAS". *Microchem. J.,* **96** : 58, 2010

PARK, S. H. & BEAN, S. R. "Investigation and optimization of the factors influencing sorghum protein extraction". *J. Agric. Food Chem.,* **51** : 7050, 2003

PATTERSON, K. Y.; VEILLON, C.; HILL, A. D.; MOSER-VEILLONC P. B.; O'HAVERB, T. C. "Measurement of calcium stable isotope tracers using cool plasma ICP-MS". *J. Anal. At. Spectrom.,* **14** : 1673, 1999

PEREIRA, C. D.; GARCIA, E. E.; SILVA, F. V.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. "Behaviour of arsenic and selenium in an ICP-QMS with collision and reaction interface" *J. Anal. At. Spectrom.,* **25** : 1763, 2010

PICKARDT, C.; NEIDHART, S.; GRIESBACH, C.; DUBE, M.; KNAUF, U.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. "Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (Helianthus annuus L.) meal". *Food Hydrocolloids,* **23** : 1966, 2009

PREVIDELLO, B. A. F.; CARVALHO, F. R.; TESSARO, A. L.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N. "O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais". *Quim. Nova,* **29** : 600, 2006

SANTOS, F. A.; LIMA, P. M.; NEVES, R. C. F.; MORAES, P. M.; PÉREZ, C. A.; SILVA, M. O. A.; ARRUDA, M. A. Z.; CASTRO, R. C.; PADILHA, P. M. "Metallomic study on plasma samples from Nile tilapia using Sr-XRF and GFAAS after separaton by 2D PAGE: initial results". *Microchim. Acta,* **173** : 43, 2011

SGARBIERI, V. C. *Proteínas em Alimentos Protéicos – Propriedades, Degradações e Modificações.* São Paulo, Varela, 2006. p. 517

SIC – Serviço de informação da carne; Valor nutritivo da carne; disponível em http://www.sic.org.br/PDF/Valornutritivo.pdf; Acesso 01/09/11.

SILVA JR., J. G. *Cromatografia de Proteínas – Guia Teórico e Prático.* Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2004. p. 111

SMITH, D. W. *Inorganic Substances - A Prelude to the Study of Descriptive Inorganic Chemistry*. Cambridge, Cambridge University Press, 1990. p. 396

SZPUNAR, J.; MAKAROV, A.; PIEPER, T.; KEPPLER, B. K.; ŁOBIŃSKI, R. "Investigation of metallodrug–protein interactions by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)". *Anal. Chim. Acta,* **387** : 135, 1999

SUN, Y.; BAI, S.; GU, L.; TONG, X. D.; ICHIKAWA, S.; FURUSAKI, S. "Effect of hexanol as a cosolvent on partitioning and mass transfer rate of protein extraction using reversed micelles of CB-modified lecithin". *Biochem. Eng. J.*, **3** : 9, 1999

SUN, X. H.; ZHU, K. X.; ZHOU, H. M. "Protein extraction from defatted wheat germ by reverse micelles: Optimization of the forward extraction". *J. Cereal Sci.*, **48** : 829, 2008

SUSSULINI, A.; GARCIA, J.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; FLORES, E. M. M.; PÉREZ, C. A.; ARRUDA, M. A. Z. "Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis". *Microchim. Acta,* **158** : 173, 2007

TABILO, G.; FLORES, M.; FISZMAN, S. M.; TOLDRA, F. "Postmortem meat quality and sex affect textural properties and protein breakdown of dry-cured ham". *Meat Sci.,* **51** : 255, 1999

TEMPLETON D. M. "Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches". *Pure Appl. Chem.,* **72** : 1453, 2000

THOMAS R. *Pratical Guide to ICP-MS – A Tutorial for Beginners.* EUA, CRC press, 2008. p. 347

TOLDRA, F. *Handbook of Meat Processing.* Iowa, Wiley-Blackwell, 2010. p. 566

TREVIZAN, L. C. *Avaliação das condições operacionais de espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente com configuração axial*. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar, 2007. Tese de doutorado, 136p.

VIEIRA, E. C.; *Avaliação de potencialidades e aplicações de espectrômetros de plasma acoplados indutivamente em analises químicas*. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar, 2007. Tese de doutorado, 112p.

WANI, A. A.; KAUR, D.; AHMED, I.; SOGI, D. S. "Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology". *LWT - Food Sci. Technol.*, **41** : 1514, 2008

WEB OF KNOWLEDGE; disponível em http://www.isiknowledge.com; Acesso 01/08/11

WEDEKIND, K. J.; HORTIN, A. E.; BAKER, D. H. "Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate, and zinc oxide". *J. Anim. Sci.,* **70** : 178, 1992